



Università di Pisa

Scuola di Specializzazione di Patologia e Clinica degli Animali d'Affezione

**Effetto su alcune caratteristiche spermatiche del
Congelamento del seme canino in diluenti con
diverse concentrazioni di Trolox®**

Candidata: Kelmy Melaré

Relatore: Dott.ssa Rota Alessandra

ANNO 2013/2014

“L’unico difetto dei cani è
che hanno fiducia negli esseri umani.”

(Autore Sconosciuto)

Sommario

Riassunto.....	5
Abstract.....	5
Parte Generale.....	6
Storia dell' inseminazione artificiale.....	7
Il prelievo e la valutazione del seme.....	8
Prelievo del seme.....	8
Valutazione del seme.....	12
Il congelamento del seme.....	26
Diluenti per il congelamento	28
Protocolli di congelamento.....	31
I metodi di congelamento.....	35
Lo stress ossidativo	37
Gli antiossidanti	38
Glutathione (GSH).....	39
Superossido dismutasi (SOD).....	39
Enzima glutathione perossidasi	40
Fosfolipide-idroperossido glutathione perossidasi.....	40
Catalasi (CAT)	40
Vitamina C.....	41
Vitamina E	41
Trolox®	42
Diluenti contenenti antiossidanti	43
Taurina ed ipotaurina	43
Catalasi (CAT)	43
Vitamina C.....	44
Vitamina E	44
Trolox®	45
Parte sperimentale	46
Scopo della tesi	47
Materiali e metodi	48
Animali	48
Diluenti.....	48
Prelievo e valutazione del seme fresco	50

Congelamento del seme	50
Scongelamento del seme e valutazioni post-scongelamento	51
Analisi statistica	53
Risultati	54
Caratteristiche del seme fresco	54
Motilità post-scongelamento	55
Integrità della membrana plasmatica	64
Discussione	65
Bibliografia	68
Ringraziamento	87

Riassunto

Parole chiave: cane; seme; congelamento; motilità; Trolox.

Il seme congelato può essere conservato per un tempo potenzialmente indefinito, ma questa tecnica presenta alcuni svantaggi, come la riduzione della capacità di fertilizzare degli spermatozoi, dovuta in parte all'aumento dei livelli delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS). Questi composti danneggiano le membrane, le proteine, ed il DNA degli spermatozoi ed un loro aumento è correlato con una diminuzione della motilità. Lo scopo di questa tesi è stato quello di verificare se l'aggiunta al diluente per il congelamento del seme dall'antiossidante Trolox® (un analogo idrosolubile del tocoferolo), potesse mantenere meglio motilità ed integrità della membrana plasmatica. Il seme di 9 cani è stato congelato in due step in diluenti a base di Tris, citrato e fruttosio con una concentrazione finale del 5% di glicerolo e dello 0,5% di Equex STM paste (CONTR) a cui sono stati aggiunte 100, 200 o 400 µM di Trolox®, T100, T200 e T400 rispettivamente. Dopo conservazione in azoto liquido per almeno 1 settimana le paillettes sono state scongelate e valutate dopo 0, 1, 2 e 3 ore di incubazione a 37°C con Computer Assisted Sperm Analyzer; mentre l'integrità di membrana (HOS-test) è stata valutata 0 e 2 ore dopo scongelamento. All'ora 0 e all'ora 1 non vi era alcuna differenza tra i trattamenti, mentre all'ora 2 e all'ora 3 T400 aveva motilità totale, progressiva e rapida inferiore al CONTR. Anche la percentuale di spermatozoi con membrana plasmatica integra non differiva mai significativamente tra i gruppi. In conclusione, l'aggiunta di Trolox® alle concentrazioni di 100, 200 µM non ha migliorato le caratteristiche del seme canino post-congelamento, mentre 400 µM ne hanno peggiorate la motilità.

Abstract

Keywords: dog; semen; cryopreservation; motility; Trolox.

Frozen semen can be preserved for a potentially indefinite time, but this technique has some disadvantages, such as the reduction of the sperm cells fertilizing ability, partially due to the increased levels of Reactive Oxygen Species (ROS). These compounds cause a damage to spermatozoal membranes, proteins and DNA, and their increase is related to a reduction of motility. The aim of this thesis was to evaluate if the addition to the freezing extender of antioxidants, Trolox® (a water-soluble tocopherol analogue), would better preserve motility, plasma membrane integrity. Semen of 9 dogs was frozen in two steps in a Tris, citrate and fructose extender with a final concentration of 5% glycerol and 0.5% Equex STM paste (CONTR) to which added 100, 200 or 400 µM Trolox® (TROL), T100, T200 and T400 respectively. After preservation in liquid nitrogen for at least one week, straws were thawed and evaluated after 0, 1, 2 and 3 hours of incubation at 37°C with a Computer Assisted Sperm Analyser; while plasma membrane integrity (HOS-test) were evaluated after post-thaw, at hour 0 and hour 2. There was no difference between treatments at hour 0 and 1, while hour 2 and hour 3 T400 had total motility, progressive and rapid less than the CONTR. The proportion of intact plasma membranes was also never significantly different between groups. In conclusion, the addition of Trolox® at concentrations of 100, 200 µM did not improve the characteristics of the seed canine post-freezing, while 400 µM have worsened motility.

Parte Generale

Storia dell' inseminazione artificiale

La tecnica dell' inseminazione artificiale (IA) è molto antica, e benché fosse già stata utilizzata precedentemente, è stata documentata scientificamente per la prima volta da Lazzaro Spallazani, nel secolo VXIII, ed è utilizzata in zootecnia dalla fine degli anni cinquanta, per quanto riguardalo sperma fresco, e dagli anni sessanta, per il seme congelato. E solo negli anni novanta, però, che questa tecnica è stata introdotta nel mondo dell'allevamento canino, in particolare in USA e nei paesi nordici (Foote, 2002; England e Millar, 2008). La fisiologia riproduttiva di questa specie e la risposta sfavorevole all'inseminazione con sperma canino congelato sono stati i due principali vincoli agli sforzi iniziali per migliorare la tecnica di IA nei cani. Molte ricerche sono stata effettuate in quelle aree, soprattutto nel Nord Europeo, generando una grande quantità di informazioni e consentendo lo sviluppo tecnico, in particolare nel seme canino.(Linde Forsberg , 2005a).

Secondo Linde-Forsberg, da tutte le IA eseguite nei cani dai veterinari in Svezia, circa il 50-55% è fatto con seme fresco, raccolto presso la clinica, 10% con seme refrigerato e circa il 35-40% con seme congelato. Tuttavia, almeno in Portogallo, l'uso di seme refrigerato importato è molto più frequente che l'uso di seme congelato rispetto ai paesi del Nord Europeo. La ricerca su IA nel cane domestico, include anche lo studio di altre tecnologie, in particolare la sopravvivenza degli spermatozoi al congelamento e l'identificazione di componenti deleteri per gli spermatozoi o la fertilizzazione, fornendo informazione importanti per la conservazione del seme canino (Linde, 2001; Forsberg, 2005a).

In seguito alla crescita della domanda d' IA da parte di allevatori e proprietari e è estensione di questa pratica al seme conservato come strumento di gestione dall'allevamento canino, anche attraverso lo scambio internazionale di seme congelato, le caratteristiche morfologiche e generali dei cani possono essere migliorate più velocemente e la consanguineità all'interno di razze può essere ridotta. Questo perché, con la diffusione di seme canino congelato, gli allevatori possono ora selezionare stalloni provenienti da tutto il mondo, senza lo stress ed il costo legati al trasporto degli animali. Inoltre, è possibile conservare lo sperma di cani di valore in una banca dello sperma ed utilizzarlo in successive generazioni, anche dopo la loro morte o la fine dell'età riproduttiva. Inoltre, gli allevatori sono anche consapevoli dei benefici sanitari connessi con IA. Evitando il contatto diretto tra maschio e femmina, l'IA riduce anche la diffusione di malattie di trasmissione sessuale, come quelle originate da *Brucella canis* e *Herpes virus*.(Linde Forsberg, 2005; Farstad, 2010).

Nell'IA il seme viene raccolto manualmente da un maschio stallone e successivamente depositato (inseminato) nella femmina in modo che la fecondazione possa avvenire in assenza di accoppiamento naturale. Il seme può essere utilizzato fresco oppure refrigerato (4°C) o, ancora, congelato (- 196°C)(Linde-Forsberg e Forsberg, 1993).

Il prelievo e la valutazione del seme

Prelievo del seme

Attualmente il metodo più comune per il prelievo seminale nel cane è la manipolazione digitale(Kutzler, 2005).Questo metodo permette, più facilmente, raccogliere separatamente le tre frazioni spermatica (Johnston et al., 2001). Questo semplice metodo è stato già utilizzato nel 1780 da Abbé Spallanzani (Fontbonne e Dumont, 1992).

Altri metodi possono essere menzionati anche se meno utilizzati come, ad esempio, la vagina artificiale. Questo metodo di raccolta ha il vantaggio per avvicinarsi di più a un accoppiamento naturale, per cui le vagine artificiale devono avere una dimensione adatte per ogni taglia; gli svantaggi sono la difficoltà del frazionamento del liquido seminale(Fontbonne and Dumont, 1992) e l'effetto del lattice delle vagine artificiali sulla motilità degli spermatozoi, se in contatto per tempo molto prolungato (Freshman, 2002). L'elettroeiaculazione è un altro metodo, utilizzato principalmente nei gatti, che può essere applicato al cane. Questo metodo di raccolta non è comunemente utilizzato perché richiede l'anestesia generale e aumenta il rischio di contaminazione dello sperma con l'urina (Johnston et al., 2001b).

Il prelievo del seme deve essere realizzato in una stanza tranquilla e isolata (Freshman, 2002).

La raccolta dello sperma di solito è semplice se il cane è sessualmente eccitato. La presenza di una femmina in pro-estro o in estro può aiutare nella procedura e rendere più facile il prelievo (Farstad, 2011). La mancanza di una cagna in estro non dovrebbe comunque impedire un tentativo di raccogliere un campione di sperma (Kutzler,2005). La secrezione vaginale di cagne in estro su tamponi, può essere conservata congelata e usata per stimolare i cani facendolo annusare mentre si fa il prelievo. Esiste anche un feromone di sintesi, il metil-p-idrossibenzoato disponibile commercialmente negli Stati Uniti (Goodwin et al., 1979; England, 2013).

Il prelievo di sperma deve essere programmato, e l'intervallo tra i prelievi o tra l'accoppiamento naturale e la raccolta, deve essere registrata, se il maschio è utilizzato regolarmente. L'intervallo ideale tra i prelievi sono di 2-5 giorni, mentre intervalli più lunghi di 10 giorni potrebbero comportare un aumento del numero di anomalie morfologiche e una diminuzione della motilità (Johnston et al., 2001; Freshman, 2002).

Alcuni problemi possono provocare una eiaculazione incompleta o assente, come un processo patologico, mancanza di eccitazione, cani inesperti (senza presenza di una cagna), cani timidi, pavimenti scivolosi o personale che indossa camici bianchi (England, 2013). Ogni distrazione o procedure che potrebbero indurre l'ansia dovrebbero essere assenti o ridotti al minimo. La paura e il dolore possono impedire ad un cane di raggiungere una erezione e dare un eiaculato completo. Per i maschi eccessivamente timidi, è consigliato farli giocare con il proprietario, o con il prelevatore prima del prelievo, potendo migliorare la qualità del liquido seminale (Kutzler, 2005).

I materiali necessari per la raccolta dello sperma e per la sua valutazione dipendono dal metodo utilizzato e dal livello di esperienza del veterinario (Kutzler, 2005).

I materiali che dobbiamo avere per fare il prelievo di seme sono:

- 1- Due o tre contenitori di vetro o plastica o vagine artificiali
- 2- Due o tre provette di vetro o plastica
- 3- Bagno Maria mantenuto a 37°C con all'interno un sopporto per le provette
- 4- Microscopio con tavolinetto riscaldato, sempre a 37 °C.
- 5- Vetrini a 37°C
- 6- Pipette
- 7- Colorante eosina nigrosina o altro colorante per spermatologia
- 8- Camera di Neubauer o altra camera contaglobuli (England, 2013).
- 9- Centrifuga
- 10- Tappetino di gomma, per evitare che il cane scivoli (Freshman, 2002)

Il prelievo in cani di razze piccole di solito è effettuato su un tavolo con una superficie adatta, invece per i cani di grande mole questo viene fatto sul pavimento (England, 2013).

Mentre il cane annusa la zona perineale della cagna, il veterinario addetto al prelievo si inginocchia sul lato sinistro del cane (se è mancino a destra) e con la mano destra si massaggia il pene nel prepuzio. Con la mano



Figura 1. Stimolazione olfattiva

sinistra si tiene la vagina artificiale, con la provetta di raccolta attaccato alla punta (Freshman, 2002). Quando il pene del cane raggiunge il 40 al 50% d'erezione, il prepuzio viene represso caudalmente oltre il bulbo del glande introducendo la vagina artificiale e viene applicata una costante pressione al pene dietro al bulbo glandis stringendo ad anello il dito indice e il pollice (Kutzler, 2005). Se il bulbo glandis è aumentato di volume in modo che il prepuzio non può essere spostato indietro, il cane deve essere allontanato dalla cagna, essere distratto, facendo calare così l'erezione. Erezione completa e eiaculazione mentre il bulbo è all'interno del prepuzio possono essere dolorose e il risultato sarà un prelievo incompleto (Freshman, 2002).

Durante la spinta pelvica, i flaconi rigidi devono essere tenuti ad una certa distanza dal pene, per evitare traumi. Quando i movimenti pelvici sono finiti e il cane solleva la sua gamba posteriore, e dovrebbe essere ottenuto una rotazione all'indietro di 180° del pene e il pene deve



Figura 2 . Prelievo del seme con contenitore



Figura 3. Prelievo del seme con vagina artificiale

quindi essere diretto nel cono di raccolta o imbuto (Linde Forsberg, 2005a; Farstad, 2010).

L'eiaculato consiste di tre frazioni: la prima e la terza frazione sono costituite da liquido prostatico, e la seconda è ricca di spermatozoi (England et al., 1990). La prima frazione, la pre spermatica, viene emessa in 0.5-1 minuto ed è incolore, con un intervallo di volume di 1-5 ml. Viene espulsa durante la prima fase di erezione, in presenza di evidente movimento copulatorio. La seconda frazione, quella ricca in spermatozoi, è rapidamente completata, 1-2 minuti, ed è di colorazione bianco grigiastro, con un volume di 1-3 ml. Viene raccolta quando il movimento del maschio cessa e si osserva piena erezione. La terza frazione, viene dalla prostata e può raggiungere i 30-40 ml, il tempo di emissione può essere di 5-30 minuti per essere completato (Günzel-Apel, 1994; Johnston et al., 2001).

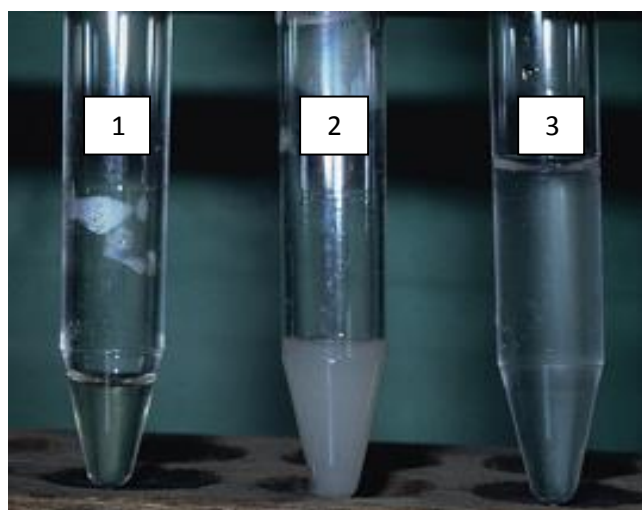


Figura 4. Frazione dell'eiaculato. 1 pre-spermatica; 2 spermatica; 3 post-spermatica (England G. 2013).

Si crede che il liquido prostatico (2-20 ml) possa facilitare la disposizione intrauterina degli spermatozoi tramite il lavaggio del tratto riproduttivo femminile durante il legame coitale. Ci sono stati alcuni rapporti contrastanti riguardanti l'effetto del liquido prostatico sulla funzione degli spermatozoi nel liquido seminale. Alcuni autori hanno dimostrato che il liquido prostatico compromette la funzionalità degli spermatozoi durante la conservazione del seme, mentre altri studi hanno dimostrato che il liquido prostatico migliora la fertilità del seme congelato, e ha un effetto positivo sulla qualità post-scongelo (Farstad, 2013).

Il prelievo può essere ripetuto un'ora dopo la prima raccolta senza un cambiamento nella qualità del seme nel secondo eiaculato (Kutzler, 2005). England, segnala che questa tecnica risulta nel 70% di spermatozoi in più quando combinato con il primo prelievo. La

somministrazione di ossitocina (10UI IM) o di prostaglandina F2alfa (2,5 mg IM) 10 minuti prima del prelievo, in tre cani samoiedo, non ha aumentato il numero di spermatozoi nel liquido seminale (Kutzler, 2005).

Valutazione del seme

Subito dopo la raccolta, la frazione ricca di spermatozoi viene valutata macroscopicamente (volume, colore e pH) e microscopicamente (motilità, concentrazione, morfologia, integrità della membrana, citologia, ecc), specialmente quando il campione deve essere congelato o refrigerato (Rijsselaere, et al., 2011).

Per non danneggiare lo sperma, questo dovrebbe essere mantenuto tra la temperatura corporea (37°C) e la temperatura dell'ambiente (20°C) (Kutzler,2005).

Esame Macroscopico

Volume

Il volume può essere misurato utilizzando contenitori graduati oppure utilizzando pipette automatiche. È un parametro influenzato da molti fattori tra cui taglia ed età dell'animale, dimensione della prostata e grado di eccitazione dell'animale durante il prelievo ed quindi ampiamente variabile da un soggetto all'altro (Payan-Carreira et al., 2011). Il volume della prima, della seconda e della terza frazione è rispettivamente di 0,5-5 ml, 1-4 ml e 1-80 ml. Il volume totale può essere quindi compreso tra 2,5 e 89 ml (Dubiel, 1973; England, 1992).

Il volume non è un indicatore della qualità del seme nei cani. Tuttavia, la misura del volume è parte del calcolo del numero totale di spermatozoi nel campione, che è un indicatore di qualità del seme (Root Kustritz, 2007).

La diminuzione del volume dell'eiaculato è riconducibile a patologie infiammatorie o degenerative prostatiche, scarsa libido, lesioni flogistiche del testicolo, dell'epididimo, dei vasi deferenti o dell'uretra (Payan- Carriera et al., 2011).

Colore

Il colore di intero eiaculato dipende dal volume della terza frazione di liquido seminale raccolto, dalla concentrazione di spermatozoi per ml e dalla potenziale presenza di cellule non germinali nel liquido seminale. Il colore fisiologico di tutto il liquido seminale è grigio-

bianco, tanto più torbido quanto maggiore è il numero di spermatozoi presenti. Una marcata trasparenza dell'eiaculato è indice di oligospermia o azoospermia, che dovranno comunque essere confermate da valutazione di tipo microscopico e mediante il dosaggio della fosfatasi alcalina seminale (Payan-Carriera et al., 2011).

Colori patologici includono: verde- grigiastro, tipico della presenza di pus; rosso o rosa, specifico per la contaminazione con eritrociti (emorragie da uretra o corpi cavernosi o prostatite); giallo, indicativo di contaminazione con urine; marrone, indicativo di presenza di sangue digerito (Payan-Carriera et al., 2011). La presenza di una piccola quantità di sangue (superiore al 2%) ha effetti negativi sulla qualità dello sperma dopo congelamento e scongelamento (Rijsselaere, 2004). Per Freshman, il sangue non ha alcun effetto sulla motilità degli spermatozoi canini fino a 6 ore di contatto (Freshman, 2002).

pH

Il pH normale del plasma seminale canino è compreso tra 6,3 e 6,7 e viene misurato utilizzando un pHmetro o mediante cartine colorimetriche. L'importanza della misurazione del pH è limitata alla diagnosi di patologie flogistiche a carico della prostata ed alla scelta del principio attivo dell'antibiotico più adatto o alla decisione dell' utilizzo del plasma seminale per un'eventuale diluizione o dopo lo scongelamento (Bartlett, 1962; Johnston, 1991).

Esame Microscopico

Motilità

La motilità è solo una dei tanti importanti attributi di un spermatozoo fertile, è stato il primo indicatore e funzionalità spermatica e continua ad essere quello più utilizzato (Scott, 2000).

La motilità degli spermatozoi deve essere valutata immediatamente dopo il prelievo (Freshman, 2002). Viene posta una goccia, 5-10 microlitri, tra vetrino e coprioggetto riscaldati e si osserva la motilità in un microscopio con un tavolinetto riscaldato a 37°C (Feldman e Nelson, 1987; Günze-Apel, 1994; Johnston et al., 2001b; Freshman, 2002). Uno studio recente indica che un vetrino riscaldato potrebbe non essere necessario perché lo sperma canino è resistente al shock da freddo, almeno di sopra di 21°C, invece, altre studi indicano che il freddo può essere una preoccupazione per la diminuzione della motilità. Soggettivamente, la motilità spermatica è migliorata quando valutata su un vetrino caldo (Freshman, 2002). Questo è vero anche quando si utilizza un analizzatore di immagine

computerizzato (Rijssiliarie, 2005).

La valutazione deve essere effettuata con una obiettiva da 20x e 40x con il condensatore abbassato. Se il campione è troppo concentrato per valutare la motilità, una goccia di sperma può essere diluito con una goccia di soluzione salina tamponata con un pH appropriato (Freshman, 2002) o diluito con plasma seminale autologo, con PBS, con una soluzione a base di TRIS, oppure con diluenti specifici per il seme (Purswell et al., 1992). Non è noto quale tra queste soluzioni sia più vantaggiosa: il plasma seminale ha mostrato effetti positivi e negativi in diversi studi (Foote, 1964) e comunque in condizioni patologiche può avere una composizione ed un pH anomali capaci di diminuire la motilità (Wales e White, 1963). I diluenti per il seme hanno una composizione lievemente viscosa che può rallentare i movimenti degli spermatozoi, mentre le altre soluzioni hanno un pH variabile in grado di influenzare negativamente la motilità (Johnston et al., 2001).

La motilità è espressa come percentuale di spermatozoi mobili o progressivamente mobili su totale (Feldman e Nelson, 1987) ed è un parametro correlato positivamente con la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali (Ellington et al., 1993) ed a membrana integra (Kumi-Diaka, 1993; Rodrigues-Gil et al., 1994). La percentuale totale degli spermatozoi mobili nell'eiaculato è tra il 70-90% (Farstad, 2011), anche se può essere più basso dopo lunghi periodi di riposo sessuale. È stato proposto che i cani normalmente fertili debbano avere almeno 70% (Larsen, 1980).

Frequentemente nella pratica clinica canina viene espressa come “motilità soggettiva” in virtù dell'immediatezza del metodo, della sua semplicità d'esecuzione ed economicità. Il limite di tale metodo è che è strettamente operatore-specifica e che non possono essere confrontati valori di motilità espressi da diversi laboratori (Peña, 2004). La motilità soggettiva si determina ponendo due gocce di 5-10 microlitri di seme su vetrino riscaldato a 37°C. Ciascuna goccia di seme viene ricoperta da un coprioggetto ed osservata ad un ingrandimento di 100x ed a contrasto di fase (Peña 2004; Payan-Carreira et al., 2011). Uno spermatozoo con una normale motilità progressiva dovrebbe attraversare il campo microscopico in 2-3 secondi (Root Kustritz, 2007). La valutazione viene espressa dopo aver osservato in entrambe le gocce molteplici campi microscopici, evitando quelli prossimi alle bolle d'aria, dove la motilità sembra maggiore, e quelli alla periferia delle gocce, dove è normalmente minore (Graham et al., 1980). Questa può essere descritta soggettivamente, oltre che come percentuale tra 0 e 100, su una scala da 0 a 5: dove 0 indica nessuna progressione in

avanti (necrospermia) e 5 indica il movimento in avanti più rapido. Il seme canino normale e fertile è solitamente classificato tra 3 e 5, e lo sperma da utilizzare per la crioconservazione dovrebbe mostrare la progressività più veloce (cioè preferibilmente grado 5) prima del congelamento. Se il seme è stato congelato, la motilità progressiva post-congelamento dovrebbe essere al minimo del 50% se deve essere usato per la IA (Farstad, 2010).

Una diminuzione della percentuale di motilità può essere causata da shock termico, contaminazione con acqua, diluenti acidi, urine, pus, sangue e lubrificante, una lunga astinenza sessuale, oppure una malattia sistemica o infettiva (Payan-Carreira et al., 2011).

Durante la valutazione della motilità, valutare anche gli spermatozoi agglutinati. L'aderenza al tuorlo, materiale del diluente, detriti o bolle d'aria non deve causare preoccupazione (Freshman, 2002).

Il numero minimo di normale di spermatozoi mobili necessario per una ottimale fertilità non è stata determinata nei cani. Per l'inseminazione vaginale con sperma fresco, la dose ottimale per la maggiore fertilità è di 200×10^6 spermatozoi mobili (Tsutsui et al., 1988). Per il seme congelato depositato nell'utero, è raccomandato una dose di inseminazione contenente in circa 150×10^6 - 200×10^6 di spermatozoi mobili (Morton e Bruce, 1989; Farstad e Andersen Berg, 1989).

Basata principalmente sulla valutazione dello spermatozoo individuale, ed utilizzata anche per il seme canino, la Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) è stata originalmente descritta dal Dott. Foster più di 30 anni fa. Nei cani e gatti, CASA è stato descritto da Gunzel-Apel et al., 1994 e Stachecki et al., 1998. Successivamente numerosi sistemi CASA sono entrati in commercio per l'utilizzo in cani e gatti, sia per scopi di ricerca o in cliniche, ma a causa dei costi della strumentazione e del software viene utilizzato quasi esclusivamente nel campo di ricerca (Peña, 2004; Rijssiliarie, 2005). I sistemi CASA offrono un preciso e rapido calcolo dei diversi parametri seminali, come motilità totale e progressiva, movimenti rapido, medio o lento degli spermatozoi, linearità di movimento degli spermatozoi, frequenza beat cross, l'ampiezza dello spostamento laterale della testa, e diversi parametri di velocità. (Rijssiliarie et al., 2012).

I valori cinematici forniti dal sistema CASA sono:

- Velocità curvilinea (VCL): è la velocità in $\mu\text{m/s}$ dello spermatozoo misurata sulla traiettoria percorsa.
- Velocità rettilinea (VSL): è la velocità in $\mu\text{m/s}$ su una traiettoria rettilinea che collega i punti in cui è situato lo spermatozoo all'inizio ed alla fine della misurazione.
- Velocità media (VAP): è la velocità in $\mu\text{m/s}$ misurata su una traiettoria media.
- Linearity coefficient (LIN): è il rapporto percentuale VSL/VCL .
- Straightness coefficient (STR): è il rapporto percentuale VSL/VAP . Stima, similmente al parametri LIN quanto la traiettoria dello spermatozoo è simile ad una linea retta (Iguer-Ouada e Versteegen, 2001).
- Wobble coefficient (WOB): è il rapporto percentuale VAP/VCL .
- Spostamento medio laterale della testa (ALH): è la misura espressa in μm dello spostamento laterale della testa rispetto alla traiettoria curvilinea (Martínez et al., 2006).
- Beat Cross Frequency (BCF): é la frequenza, espressa in Hertz, con cui la testa interseca la traiettoria media dello spermatozoo (Iguer-Ouada e Versteegen, 2001).

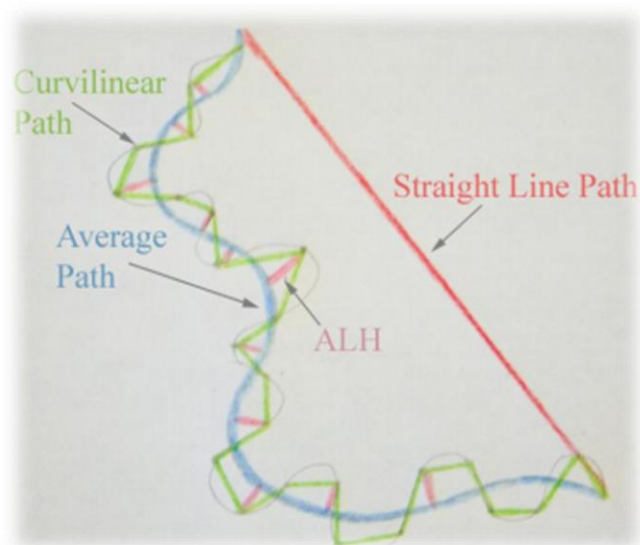


Figura 5. Traiettoria percorsa dallo spermatozoo (linea sottile grigia), traiettoria rettilinea (straight line path), curvilinea (curvilinear path) e traiettoria media (average path).

Diversi studi hanno trovato forti correlazioni tra la motilità del calcolo computerizzato, motilità progressiva e concentrazione, e la valutazione nel microscopio convenzionale. Inoltre, questi dispositivi di misura computerizzati hanno dimostrato di essere utili per valutare diverse caratteristiche seminali contemporaneamente e obiettivamente, e sono preziose per la rilevazione di cambiamenti minimi in movimento degli spermatozoi che non possono essere identificati mediante l'analisi convenzionale dello sperma. Infine, un gran numero di spermatozoi possono essere analizzati singolarmente in un breve intervallo (Rijssiliarie et al., 2012).

I sistemi CASA sono stati utilizzati per la valutazione del seme canino fresco (Günzel-Apel et al., 1993; Smith e England, 2001), refrigerato (Ponglowhapan et al., 2004) o congelato (Peña e Linde-Forsberg, 2000).

Concentrazione spermatica

La concentrazione un altro parametro misurato quando si esegue la valutazione del seme nel cane, parametro che da solo, ha poco valore come indicatore di qualità del seme, in quanto è inversamente proporzionale al volume di seme raccolto (Root Kustritz, 2007). La concentrazione spermatica del campione equivale al numero degli spermatozoi presenti in 1 ml di seme (Johnston et al., 2001).



Figura 6. Camera di Thoma

Per la determinazione si possono utilizzare il metodo delle camere di contaglobuli, o emocitometro, come la Thoma, camera di Burker o Neubauer (Rijssalaere et al., 2005) o un fotometro calibrato per lo sperma di cane (es. SpermaCue™) che prevede una lettura digitale della concentrazione di milioni di spermatozoi per ml (Farstad, 2011). Anche con il sistemi CASA si può valutare la concentrazione spermatica (Rijssalaere et al., 2005).

Per la camera di Neubauer 20 microlitri di campione vengono diluiti in 2 ml di diluente con il sistema Unopette® e il campione diluito viene osservato successivamente in entrambi i lati della camera, dopo aver atteso circa 5 minuti, per la stabilizzazione degli spermatozoi. Si conta il numero di spermatozoi presente in 9 dei 25 quadrati disegnati dalla griglia e si calcola il valore medio tra le misurazione effettuate nei due lati della camera (Johnston et al., 2001). I numeri devono essere entro il 10% l'uno dall'altro (Freshman, 2002). Invece per la

camera di Thoma il campione viene diluito in una proporzione di 1:40 ponendo 50 microlitri di seme in una provetta con 1,95 ml di soluzione di formalina o di sodio cloruro al 3% per immobilizzare gli spermatozoi. La provetta deve essere agitata bene prima di prelevarne il quantitativo necessario per riempire entrambe le parti dell'emocitometro. Da ogni lato si conta il numero di spermatozoi all'interno di dieci quadrati disegnati dalla griglia e si determina il valore medio tra i due lati. Tale valore equivale al numero di milioni di spermatozoi presenti in un millilitro di seme (Johnston et al., 2001). Il numero di spermatozoi per millilitro è moltiplicato per il volume del campione per determinare gli spermatozoi totali per eiaculato (Freshman, 2002).

La dimensione del cane deve essere considerata durante l'esame perché il numero di spermatozoi è proporzionale al peso dei testicoli, che è a sua volta, correlato alla taglia del cane (Johnston et al., 2001). I cani di grossa taglia producono un numero maggiore di spermatozoi rispetto a quelli di piccola dimensione (Johnston et al., 2001). La concentrazione può variare tra il 50×10^6 fino a 1575×10^6 spermatozoi/ml (Linde-Forsberg, 1991; Oettle 1993).

Morfologia

La valutazione della morfologia ci permette di osservare la percentuale di spermatozoi con un aspetto normale. La percentuale di spermatozoi morfologicamente normale (%MNS)



Figura 7. Spermatozoo normale

naturalmente tra soggetto e soggetto (0-95%). Oettle in un studio ha valutato la morfologia degli spermatozoi del seme di 42 cani nell'ambito delle valutazioni pre-inseminazione ed è giunto alla conclusione che la fertilità è influenzata negativamente quando la percentuale di spermatozoi normali è inferiore al 60% (Oettelé, 1993).

Per fare un vetrino per l'esame morfologico possono essere usate due tecniche diverse. In una tecnica, una goccia di colorante eosina-nigrosina (colorante di Hancock) è posta sull'estremità di un vetrino da microscopio, e mescolata, delicatamente, insieme a una goccia del campione seminale. Un secondo vetrino è utilizzato per realizzare lo striscio (come uno striscio di sangue). Il vetrino viene asciugato all'aria. Con la colorazione di eosina-nigrosina è possibile valutare la morfologia e contemporaneamente gli spermatozoi che hanno la membrana plasmatica danneggiata e non sono più fertili. La testa di questi spermatozoi sarà

colorata di rosa (Eilts, 2005). Invece un'altra tecnica, una goccia di sperma è distesa su un vetrino (come lo striscio di sangue) e poi colorato con una versione modificata di Wright-Giemsa (Diff-Quick) o con un altro colorante (es. Spermac Stain). Con il Diff-Quick il vetrino viene messo in ciascuna delle tre soluzioni per 5 minuti prima di risciacquo e asciugatura ad aria (Freshman, 2002). Un altro colorante che può essere utilizzato per verificare la morfologia e l'integrità dei acrosoma degli spermatozoi, è lo Spermac Satin®. Con questa tecnica il vetrino fissato, dopo di che viene immerso in tre coloranti, successivamente. Con questa colorazione, l'acrosoma appare verde, il nucleo rosso, mentre la regione equatoriale, il pezzo intermedio e la coda, appaiono verdi. Questa colorazione ha il vantaggio di essere veloce (quindici minuti di preparazione), facile e determina lo stato del acrosoma (Guérin, 1997). Molte nuove tecniche possono valutare la morfologia degli spermatozoi come il CASA e le tecniche di colorazione a fluorescenza. Essi consentono una più dettagliata valutazione obiettiva dello sperma (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere, et al., 2005).

La valutazione della morfologia viene eseguita esaminando il vetrino, già colorato, su microscopio sotto un obiettivo di 100 x (ad ingrandimento 1000x ed immersione olio) e contando da 100 a 200 spermatozoi (Freshman, 2002). Le percentuali di cellule con particolari difetti morfologici e cellule normali sono calcolate (Payan-Carriera, 2011). Campioni seminali normali dovrebbero avere < 10% di anomalie primarie e < 20% di anomalie secondarie. Il totale delle anomalie dovrebbero essere < 30% (Freshman, 2002).

Tradizionalmente, le anomalie spermatiche sono divise in difetti primari, che sono provenienti da alterazione della spermatogenesi, o comunque quando gli spermatozoi si trovano ancora all'interno del testicolo, e difetti secondari, che compaiono durante la maturazione dello spermatozoo, la permanenza nell'epididimo o dopo l'eiaculazione (preparazione dei campioni). Secondo un'altra classificazione spermatica, le anomalie possono essere suddivise in difetti maggiori, negativamente correlati con la fertilità, e difetti minori, non associati con la fertilità. Quando uno spermatozoo presenta più di un difetto, si registra quello più importante, se le anomalie sono d'uguale importanza, il difetto più comune viene preso in considerazione (Blom, 1972; Oettle, 1993). Altri metodi prevedono il conteggio di tutti i difetti.

Le anomalie possono essere classificate in base alla regione colpita: acrosoma, testa, tratto intermedio e coda (Christiansen, 1984, Tabella 1).

Tabella 1. Principali difetti maggiori e minori catalogati in base alla regione interessata. Oettlé e Soley, 1988.

	Difetti maggiori	Difetti minori
Difetti dell'acrosoma	Cisti acrosomiali; Anormale distribuzione del materiale acrosomiale; <i>lipped acrosome</i>	Reazione acrosomiale; acrosoma rigonfio; perdita dell'acrosoma
Difetti della testa	Macrocefalia; Microcefalia; Testa piriforme; <i>Diadem defect</i> ; Vacuoli nucleari; Teste doppie; Forme anormale; Testa increspata	Testa stretta; Testa stretta alla base; Inserimento abassiale dell' assonema; Teste staccate; Altre anomalie alla base della testa
Difetti del tratto intermedio	Gocce citoplasmatiche prossimali; Tratto intermedio rotto; pseudogocce citoplasmatiche; Tratto intermedio piegato	Gocce citoplasmatiche distali
Difetti della coda	Coda ripiegata sotto la testa	Coda ripiegata semplice; coda ripiegata doppia

I difetti del tratto intermedio e della coda, sono meglio identificabili sul seme fresco o fissato in preparati liquidi ed esaminato con microscopio a contrasto di fase, mentre per i difetti della testa e dell'acrosoma è preferibile la valutazione morfologica degli spermatozoi su strisci di seme fissati e colorati ed osservati a forte ingrandimento (1000x) con olio minerale (Peña, 2004).

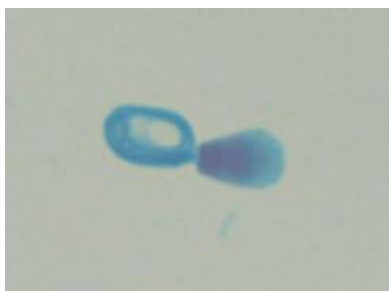


Figura 8. Coda ripiegata sotto la testa. Spermac-stain, ingrandimento 1000x.



Figura 9. Goccia citoplasmatica prossimale. Colorazione Spermac-stain. Ingrandimento 1000x



Figura 10. Acrosomal lipping. Colorazione Spermac-stain, ingrandimento 1000x.

Tabella 2. Anomalie dell'eiaculato (Fontbonne, 1995)

Anomalie	Descrizione	Origine
Azoospermia	Totale assenza di spermatozoi	<ul style="list-style-type: none"> • Prostatite • Infezioni urinarie (cistite, uretrite) • Anomalie congenite (ipoplasia testicolare, testicoli ritenuti) • Anomalie acquisite (azoospermia) • Cause ormonali (tumore dell'asse ipofisi-ipotalamo; tumore testicolare; ipotiroidismo; sindrome di Cushing; malattia di Addison) • Cause iatrogene (corticosteroidi; anabolizzanti; antifungini) • Cause infettive (brucellosi) • Altre cause (radiazioni; ipertermia; patologie autoimmunitarie o genetiche) • Idiopatica
Oligozoospermia	Pochi spermatozoi	
Astenozoospermia	Spermatozoi poco mobili	
Teratozoospermia	Molti spermatozoi anormali	
OAT	Oligo-asteno-teratozoospermia	

Alcuni difetti secondari possono essere causati dalla colorazione utilizzata e solitamente ogni colorazione è associata a difetti tipici (Sekoni, et al., 1981). I difetti secondari più frequenti sono teste staccate, code piegate ed arricciate, tratti intermedi piegati (Salisbury et al., 1942; Wong e Dhaliwal, 1985).

Nei cani è sconsigliata la conservazione mediante refrigerazione o congelamento dei campioni che presentano numerose gocce citoplasmatiche prossimali, code piegate o arricciate o tratti intermedi piegati (Morton e Bruce, 1989).

L'integrità della membrana plasmatica

L'integrità della membrana plasmatica è essenziale per la capacità fertilizzante degli spermatozoi (Rijssilarie, et al., 2005). L'integrità di membrana e la sua funzionalità sono condizioni necessarie per il metabolismo dello spermatozoo, la capacitazione, la reazione acrosomiale ed il legame alla zona pellucida dell'oocita, tuttavia non vengono esaminate routinariamente nelle valutazioni del seme (Jeyendran et al., 1984). Drevius ed Eriksson



Figura 11. Spermatozoo rigonfio all'HOS test. Microscopio a contrasto di fase.

hanno osservato le modificazioni morfologiche della membrana degli spermatozoi di diverse specie immessi in un ambiente ipotonico rispetto al plasma seminale: il volume degli spermatozoi aumenta prima impercettibilmente, poi la membrana assume una forma sferica e, a livello della coda, fa forza sull'assonema e ne provoca il piegamento o l'arricciamento. Superato un volume critico, probabilmente a causa della rottura della membrana plasmatica, la coda torna rettilinea (Drevius e Eriksson, 1966). Basandosi su queste osservazioni è stato sviluppato l'Hypo Osmotic Swelling test (HOS test), una metodica economica e relativamente semplice per la valutazione dell'integrità di membrana: un'aliquota di seme da esaminare viene posta in una soluzione ipotonica ad osmolarità definita e lasciata in incubazione a temperatura di 37°C per il tempo stabilito. Solo gli spermatozoi con membrana integra e funzionale si rigonfiano per l'ingresso d'acqua nel comparto intracellulare al fine di raggiungere l'equilibrio osmotico rispetto all'ambiente esterno (Drevius, 1972; Jeyendran et al., 1984). Il rigonfiamento è facilmente rilevabile con microscopio a contrasto di fase per il ripiegamento della coda (England e Plummer, 1993). Jeyendran ha rilevato un'elevata correlazione tra la percentuale di spermatozoi rigonfi attesi e

la percentuale di quelli osservati eseguendo l'HOS test su campioni contenenti miscele in proporzioni note di seme fresco e seme trattato termicamente e ha concluso che l'HOS test è una metodica affidabile ed accurata per la determinazione dell'integrità di membrana (Jeyendran et al., 1984).

L'integrità della membrana plasmatica può essere valutata anche utilizzando colorazioni vitali come eosina-nigrosina (Hancock, 1951), eosina- blu di anilina (Schaffer e Almquist, 1948), blu trypan (Talbot e Chacon, 1981). L'eosina-nigrosina è uno dei colorante "vivi-morti" più utilizzati in tutte le specie domestiche, perché è semplice, rapido e permette di valutare contemporaneamente le proporzioni di spermatozoi vivi e morti e di quelli normali e anormali. Queste sono dette colorazione vitale in quanto la penetrazione del colorante all'interno della cellula, non è possibile negli spermatozoi vivi, mentre quelli assumono il colorante (Peña, 2004). Un problema comune con le soluzioni di eosina-nigrosina è che può essere ipotonica e causare artefatti morfologici, soprattutto difetti della coda degli spermatozoi. L'osmolarità del colorante può essere regolata aggiungendo glucosio e tampone Tris-TES (Bamba, 1988), citrato di sodio (Barth e Oko, 1989), cloruro di sodio o soluzione tamponata salina fosfato (Dott. E Foster, 1972). Un altro problema è che gli spermatozoi possono mostrare colorazione parziale, rendendo difficile l'interpretazione. Inoltre, vari componenti, come ad esempio glicerolo o globuli, possono interferire con queste colorazioni. Durante l'ultimi 10 anni, diversi coloranti fluorescenti sono stati utilizzati e validati per la valutazione dell'integrità della membrana degli spermatozoi nei cani (Rijssilarie, 2005). Le colorazioni possono essere utilizzate singolarmente (Babcock, 1983) o in associazione (Evenson et al., 1982). Le associazioni più utilizzate prevedono la combinazione di 6-carbossifluoresceina di acetato e ioduro di propidio, oppure SYBR-14 e ioduro di propidio. Le membrane plasmatiche sono permeabili alla 6-carbossifluoresceina di acetato, che una volta all'interno dello spermatozoo viene trasformata dalle esterasi intracellulari in 6-carbossifluoresceina, una molecola che emette fluorescenza verde e che è incapace di attraversare le membrane integre. Lo ioduro di propidio penetra solo nelle membrane danneggiate, si lega al DNA ed emette fluorescenza rossa. Gli spermatozoi vitali a membrana integra sottoposti a questo tipo di colorazione emettono la fluorescenza verde della carbossifluoresceina ma non quella rossa dello ioduro di propidio; quelli vitali ma con membrana danneggiata emettono fluorescenza rossa a livello nucleare e fluorescenza verde solo a livello dell'acrosoma o dei mitocondri; infine gli spermatozoi non vitali emettono solo la fluorescenza rossa del propidio ioduro (Garner et al., 1986). La determinazione della

percentuale di spermatozoi appartenenti alle tre popolazioni è determinabile mediante citofluorimetro (Peña et al., 1998) o microscopio a fluorescenza (Rota et al., 1995). In quest'ultimo caso è possibile immobilizzare gli spermatozoi con formalina a bassa concentrazione (Harrison e Vickers, 1990). Il SYBR-14 è un colorante fluorescente che si lega agli acidi nucleici degli spermatozoi a membrana integra, il cui nucleo quindi emetterà fluorescenza verde. Gli spermatozoi non vitali emettono fluorescenza rossa, mentre quelli in condizioni compromesse esibiranno una doppia colorazione fluorescente (Garner e Johnson, 1995).

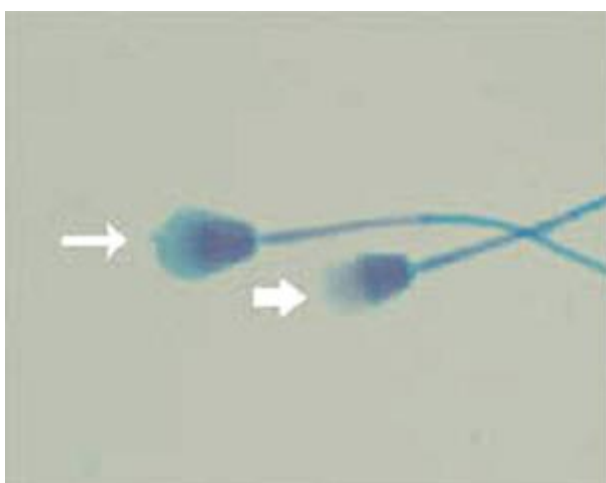


Figura 12. Ciste acrosomiale (freccia sottile) e spermatozoo privo di acrosoma (freccia spessa). Colorazione con Spermac-stain, ingrandimento 1000x.

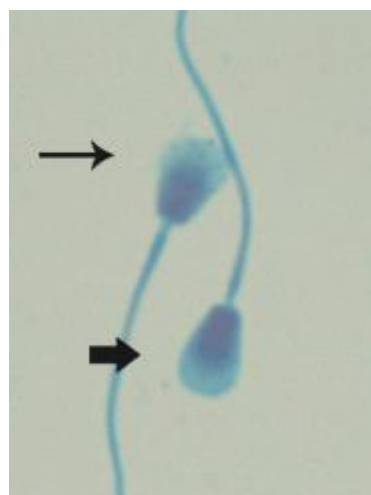


Figura 13. Acrosoma rigonfio (freccia sottile) ed acrosoma normale (freccia spessa). Colorazione con Spermac-stain, ingrandimento 1000x.

Altri esami

Citologia

La citologia della frazione prostatica e della frazione ricca degli spermatozoi devono essere valutate separatamente. Ci sono diversi modi per preparare il vetrino per la citologia. Un modo è centrifugare 0,3 a 0,5 ml del campione a 120g per 7 minuti. Il materiali che vengono sedimentati sono colorati con Diff-Quick. In alternativa, un vetrino può essere fatto dell'intero campione; tuttavia, si vedranno meno cellule. Normalmente una citologia della frazione ricca degli spermatozoi può contenere

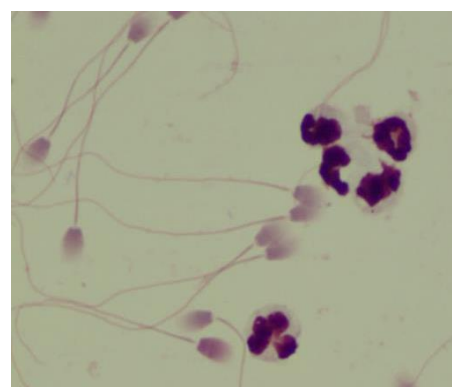


Figura 14. Presenza di neutrofili. Colorazione Diff-Quick

spermatozoi, globuli bianchi, cellule epiteliali, batteri e globuli rossi. In caso di grande numero di batteri e globuli bianchi normali o degenerati indicano infezione. Anche il liquido prostatico può contenere cellule epiteliali, batteri e globuli rossi. L'aumento dei globuli rossi può indicare una malattia prostatica o sanguinamento dal pene o prepuzio (Freshman, 2002).

Cultura seminale

Lo sperma non è sterile. Un'ampia varietà di flora normale è presente nel seme. Per fare un batteriologico occorre provare a ridurre al massimo la contaminazione, pulendo l'ostio prepuziale e l'apice del pene con una garza inumidita con soluzione salina sterile prima di iniziare la raccolta. Un campione di seme viene quindi messo in una provetta sterile. Una cultura dell'uretra distale per il confronto della flora può essere utile. Un valore superiore a 10.000 CFU di batteri/ml di sperma è indicativo di infezione. Batteri anaerobi non sono comuni nello sperma canino. Il Mycoplasma è normale nel tratto riproduttivo distale del cane; tuttavia, può causare problemi se presente in eccesso (Freshman, 2002).

Kustritz e collaboratori in un studio hanno osservato che il 55% dei cani con sovracrescita batterica nel fluido seminale non presentavano reperti di flogosi all'esame citologico del fluido stesso (Kustritz, et al., 2005). Per tale ragione l'esame colturale dovrebbe essere effettuato ad ogni valutazione del seme, a prescindere dai risultati dell'esame citologico (Johnston et al., 2001).

Fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina (ALP) è prodotta nell'epididimo. Questo lo rende un eccellente marcatore per la pervietà del sistema duttale. In un campione di seme azoospermico, la misurazione di ALP è essenziale per determinare se l'azoospermia è un problema di libido, insufficienza testicolare o blocco duttale (Freshman, 2002). Valori inferiori a 5000 UI/l suggeriscono incompleta eiaculazione o ostruzione o aplasia dell'epididimo. Valori superiori a 5000 UI/l indicano che l'eiaculazione è avvenuta in modo completo ma che è presente una disfunzione a livello testicolare che influisce sulla produzione spermatica (Stornelli et al., 2003).

Il congelamento del seme

Nel 1789, Spallanzani ha osservato, durante i suoi esperimenti, che lo sperma di rana messo nella neve rimaneva fertile. Tuttavia è solo nel 1949 che Polge e il suo gruppo hanno realizzato il primo procedimento di congelamento dello sperma realmente efficiente ed utilizzabile nella pratica, utilizzando il glicerolo come crioprotettore (England 1993; Amann, 1998).

Il congelamento del seme permette la conservazione degli spermatozoi per un tempo indeterminato, rimanendo potenzialmente fecondante quando scongelato e utilizzato nell'IA. In questo modo il seme di cani riproduttori di valore superiore può essere mantenuto in apposite banche del seme ed utilizzato anche dopo la morte dell'animale. Può offrire un metodo per effettuare scambi di materiale genetico, e quindi, portare a un miglioramento nei programmi di gestione degli allevamenti finalizzati a produrre cani da lavoro da bellezza (Concannon e Battista, 1989; Peña, et al., 2006; Abe, et al., 2008). È particolarmente indicato quando si ha la necessità di trasportare il seme per lunghe distanze o quando verrà utilizzato il materiale genetico dello stallone in un secondo momento.

Il successo della tecnica del congelamento è valutato in base alla motilità e alla vitalità spermatica dopo lo scongelamento e dipende da fattori come differenza tra razze e individui, qualità seminale, resistenza spermatica alle basse temperature e la definizione del processo utilizzato durante la crioconservazione e scongelamento (Neves et al., 2009). Il congelamento del seme è piuttosto complicato e lungo e viene comunemente eseguito in Università o grandi cliniche veterinarie (Rijssilaere et al., 2011). Le procedure coinvolte nel congelamento/scongelamento degli spermatozoi causano danni cellulari dovuti a variazioni di temperatura, formazione di cristalli di ghiaccio, danno ossidativo, danno alla membrana plasmatica, danno al DNA, stress osmotico e tossicità del crioprotettore (Ball e Vo, 2001), ognuno dei quali può provocare alterazioni ultrastrutturali, biochimiche e funzionali che riducono la vitalità degli spermatozoi (Hashida et al., 2005). Una standardizzazione della curva di raffreddamento e di congelamento è necessaria per calibrare i suoi effetti, ed che è legata al diluente utilizzato e alla temperatura dello scongelamento (Neves et al., 2009). Quando sottoposti ad un abbassamento della temperatura, gli spermatozoi possono subire dei danni strutturali noti come "*cold shock*" (Milovanov, 1936). Il cold shock si manifesta come riduzione della motilità dopo il ritorno alla temperatura fisiologica (Parks, 1997), danno alla membrana plasmatica che perde la capacità di scambio selettivo dei soluti e danno alle membrane

acrosomiali (Medeiros et al., 2002). Quando la temperatura viene ulteriormente ridotta al di sotto del punto di congelamento del diluente i danni causati dal *cold shock* si sommano a quelli cagionati dal congelamento. Se l'abbassamento di temperatura è troppo lento nell'intervallo tra -5 e -10°C l'acqua extracellulare congela mentre quella intracellulare rimane allo stato liquido. Si riduce così il quantitativo di acqua disponibile come solvente, quindi la concentrazione dei soluti aumenta e si crea un gradiente osmotico ai due lati della membrana plasmatica con conseguente disidratazione della cellula, aumento della concentrazione di soluti intracellulari e modificazione del pH. Questo fenomeno si chiama *solution effect* (Van den Berg e Rose, 1959; Van Den Berg e Soliman, 1969). Le variazioni della concentrazione di soluti e di pH causano la denaturazione delle macromolecole intracellulari e la disidratazione può essere tale da provocare il collasso della membrana cellulare (Gao et al., 1997). Se congelati troppo velocemente, gli spermatozoi non sviluppano il *solution effect*, ma perdono poca acqua, e questo causa la formazione dei cristalli di ghiaccio all'interno della cellula, che a loro volta daranno un danno irreversibile. Farrant ritiene che la sopravvivenza degli spermatozoi in queste condizioni dipenda dalla quantità e dalle dimensioni dei cristalli di ghiaccio che si formano. L'ideale per il congelamento dovrebbe essere una discesa di temperature sufficientemente lenta per permettere l'uscita d'acqua dall'interno della cellula, per osmosi, impedendo il ghiaccio intracellulare, e sufficientemente veloce per minimizzare i danni per l'esposizione prolungata all'elevata concentrazione di soluti (Farrant et al., 1997b; Escobar, 2004). Perché il seme presenti una sufficiente capacità fecondante dopo scongelamento, è fondamentale l'uso di un buon diluente, che deve contenere nutrienti per fornire energia ed una sostanza tampone, oltre ad avere una concentrazione di elettroliti all'interno della norma fisiologica. L'aggiunta di un crioprotettore è necessaria per la protezione cellulare durante il congelamento (Escobar, 2004; Silva, 2005). Il fatto che uno spermatozoo sia mobile non significa necessariamente che abbia una capacità fecondante. Per fecondare l'ovulo, è necessaria una attività metabolica per la produzione di energia, motilità progressiva, e l'integrità dell'acrosoma, che contiene gli enzimi che agiranno sulla zona pellucida e la membrana plasmatica (Oliveira, 2007).

Anche se il congelamento dello sperma canino e l'inseminazione artificiale con seme congelato nel cane non è frequentemente utilizzata come in bovini e equini, la fecondazione artificiale con seme canino congelato è stata documentata fin dal primo concepimento avvenuto nel 1969. Per i motivi, già descritti sopra, la percentuale di gravidanza ottenuta mediante inseminazione artificiale con seme congelato è inferiore rispetto a quella

conseguibile con la monta naturale e le cucciolate sono meno numerose (Lees e Castelberry, 1977; Linde-Forsberg e Forsberg, 1989; Linde-Forsberg e Forsberg, 1993; Silva et al., 1996). Per ottenere percentuali di gravidanza soddisfacenti e cucciolate più numerose è necessario effettuare l'inseminazione artificiale intrauterina, una pratica più complessa rispetto a quella vaginale (Fontbonne e Badinand, 1993; Thomassen et al., 2006). Sono state descritte tecniche come l'inseminazione intrauterina transcervicale, realizzata con catetere Norvegese o con la tecnica endoscopica (Wilson, 1993) e la intrauterina di tipo chirurgico, eseguita in laparotomia o laparoscopia. Questa ultima tecnica è sconsigliata primariamente per ragione etiche, oltre che per lo stress causato all'animale, per l'invasività della metodica, per i possibili rischi anestesilogici e per i maggiori costi per il proprietario (Wildt, 1986; England e Millar, 2008).

Diluenti per il congelamento

Prima del congelamento il seme deve essere diluito con specifici extenders, che hanno la funzione di proteggere gli spermatozoi durante il raffreddamento, il congelamento e lo scongelamento, di fornire una fonte di energia per gli spermatozoi, mantenere il pH e l'osmolarità, e di limitare lo sviluppo di batteri (England, 2013). Esistono molti diluenti per il congelamento del seme canino, alcuni commerciali a formulazione non nota e sviluppati da aziende private, altri che non sono marchi registrati, e hanno una formulazione nota e possono essere preparati nel proprio laboratorio, come la formula Andersen e l'Uppsala II extender (Linde Forsberg, 2011). Essi hanno dimostrato di essere adatti sia in vitro che in vivo (England, 1993). I diluenti contengono solitamente sostanze crioprotettive extracellulari e intracellulari (glicerolo, glicole etilenico o dimetilsolfossido), sostanze tampone come il TRIS, zuccheri (fruttosio o glucosio), sali (acido citrico), antibiotici come penicillina e streptomina e detergenti (Evans e Maxwell, 1987; Linde Forsberg, 2005).

Il tuorlo d'uovo è il composto più comunemente usato in extenders per la protezione degli spermatozoi dal raffreddamento, congelamento e scongelamento del seme. Tale azione è dovuta all'alto contenuto di fosfolipidi e di lipoproteine a bassa densità (Medeiros et al., 2002; Abe, et al., 2008). Appartiene alla categoria dei crioprotettori extracellulari, quelli che restano all'esterno delle membrane cellulari, agiscono come soluti e provocano quindi un abbassamento crioscopico del diluente e limitano la formazione di cristalli di ghiaccio extracellulari, inoltre il tuorlo d'uovo aiuta nel controllo del pH (Barbas e Mascarenhas, 2009; England, 2013). Tuttavia, in quanto composto biologico il tuorlo d'uovo è un rischio,

soprattutto quando il seme è destinato alla spedizione internazionale. Numerosi studi sono stati eseguiti per valutare se è possibile la sostituzione del tuorlo d'uovo con derivati del tuorlo d'uovo (fosfolipidi) o lecitina vegetale, per evitare l'uso di sostanze di origine animale (Farstad, 2009). Secondo Abe (2008) anche il latte scremato può sostituire il tuorlo d'uovo. È stato descritto in un studio che si è avuto successo nella inseminazione artificiale con seme congelato canino utilizzando un diluente contenente latte scremato, glucosio e glicerolo (Abe et al., 2008).

La grande maggioranza delle procedure per congelare lo sperma canino prevede l'utilizzo del glicerolo (Andersen, 1975; Peña, et al., 1998; Rota et al., 1998). Il glicerolo è un agente crioprotettivo penetrante, che provoca un riarrangiamento dei lipidi e delle proteine di membrana aumentando la fluidità di quest'ultima, sostituisce l'acqua intracellulare ed abbassa il punto di congelamento impedendo la formazione di cristalli di ghiaccio (Holt, 2000; Medeiros et al., 2002; England, 2013). La concentrazione ideale di glicerolo è legata in parte alla velocità di abbassamento della temperatura durante il congelamento. Una concentrazione eccessiva di glicerolo ha un effetto tossico sugli spermatozoi, che viene limitato quando questo viene aggiunto a basse temperature, come al termine del periodo di equilibratura. I diluenti a base di tris, glucosio e citrati offrono migliori risultati post-scongelo quando contengono glicerolo alla concentrazione del 5% rispetto a quelli con il 3% di glicerolo, soprattutto quando il congelamento è rapido (Watson, 1990; Rota, 1998;). Recentemente, è stato studiato l'effetto di glicole etilenico sullo sperma canino congelato/scongelato (Soares et al., 2002). Un significativo miglioramento della qualità del seme scongelato è stata riportata quando è stato usato 5% di glicole etilenico invece di 5% glicerolo in extender con tris e tuorlo d'uovo, contenente Equex STM Paste® (Rota et al., 2006). Soares ha comparato la motilità e la morfologia degli spermatozoi canini congelati con glicerolo 0,8 M o con differenti concentrazioni di glicole etilenico (0,25 M, 0,5 M, 1 M) ed ha concluso che il glicole etilenico può sostituire il glicerolo come agente crioprotettivo (Soares, et al., 2002). L'effetto dal glicole etilenico sullo sperma canino rimane controverso, e in effetti alcuni ricercatori non sono riusciti a trovare alcuna differenza significativa nel post-scongelo sia con 5% di glicerolo che con 5% di glicole etilenico aggiunti ad un diluente contenente acido citrico, tuorlo d'uovo e tris (Martins-Bessa et al., 2006). Questo diluente conteneva fruttosio, invece del glucosio descritto da Rota et al., 2006. Studi realizzati con diluente a base d'acqua di cocco, con tre differenti concentrazioni di glicerolo, non hanno rilevato differenze tra questi tre gruppi in quanto a motilità e vigore degli spermatozoi. È stata

però osservata una minore percentuale di difetti totali e secondari in diluente a base d'acqua di cocco con il 6% di glicerolo (Cardoso et al., 2003). Secondo Rota et al., gli spermatozoi congelati con diluente con glicole etilenico mostrano percentuali di motilità maggiori rispetto a quelli trattati con glicerolo, tuttavia ad 1 ora post-scongelo le differenze non sono più significative e l'integrità di membrana valutata mediante HOS test non differisce nei 2 gruppi (Rota et al., 2006).

Il TRIS, tris-idrossimetil-amminometano, è la sostanza tamponante più utilizzata per la crioprotezione del seme canino (Silva et al., 2002), ma esistono anche il Tes (N-tris(idrossimetil) metile 2-aminoetanosulfonico), citrato e fosfato di sodio (Sila e Verstegen, 1995; Rota, 1998; Silva, 2001). Il citrato ha una migliore funzione tamponante che il fosfato, e il tampone di bicarbonato è dannoso per la sopravvivenza degli spermatozoi (Foote Leonard, 1964; Foote, 1964). La maggior parte degli extenders commerciali per sperma canino, sono basati su modificazioni del tampone TRIS, sia con fruttosio che con altri zuccheri, come, lattosio o glucosio, e talvolta con altre sostanze, quali sodio dodecil solfato (Orvus ES-Paste™ o Equex STM Paste™) e amminoacidi (Farstad, 2011).

L'aggiunta del SDS (sodio dodecil solfato), che è un detergente anionico, che ha la capacità di stabilizzare le proteine in diluenti per congelamento sembra essere benefica per varie specie, incluso la specie canina. Studi realizzati hanno costatato l'effetto benefico dei detergenti sulle cellule spermatiche, favorendo l'azione dei fosfolipidi del tuorlo d'uovo, ed aumentando la protezione degli spermatozoi contro lo shock termico (Thomas et al., 1992; Rota et al., 1997; Rota et al., 1999; Holt, 2000a; Peña, 2000; Linde-Forsberg, 2000). L'Equex aggiunto nel diluente di Tris-tuorlo d'uovo aumenta considerabilmente la termo resistenza e riduce le alterazioni causate dal processo di congelamento e scongelamento. Tuttavia, l'effetto protettore è maggiore quando gli spermatozoi sono esposti all'Equex immediatamente prima del congelamento anzi che durante il periodo di equilibratura. Ström et al., affermano che la sostanza aumenta la capacità di legame degli spermatozoi post-scongelo alla zona pellucida di un ovocita omologo (Ström, et al., 2000) e la percentuale di gravidanza ottenibile in vivo sia mediante inseminazione artificiale intravaginale che intrauterina (Rota et al., 1999). Pena, avverte del fatto che l'esposizione prolungata degli spermatozoi al SDS o alle lipoproteine del tuorlo d'uovo trattate con SDS possono risultare in un eccesso di fluidità della membrana spermatica e indica che il suo effetto benefico dipende del tempo di esposizione degli spermatozoi al diluente (Peña, 2000).

Il meccanismo d'azione degli aminoacidi aggiunti nel diluente sarebbe quello di proteggere la cellula riducendo la quantità di ghiaccio intracellulare e limitando la disidratazione osmotica durante il congelamento. Inoltre, gli aminoacidi possono aiutare nella stabilizzazione della membrana spermatica (Peña et al., 1998a). Diversi aminoacidi, tra cui la glicina, tendono essere inclusi nella conservazione del seme (Papa et al., 1993; Ball et al., 2001; Bilodeau, et al., 2001). Secondo Papa et al., l'azione della glicina ancora non è totalmente chiara, ma si sa che gli aminoacidi partecipano nella sintesi dei enzimi antiossidanti (Glutathione perossidasi), riducendo la formazione dei radicali liberi, e conseguentemente, proteggendo la membrana cellulare dall'ossidazione (Papa et al., 1993).

Gli zuccheri, come glucosio, fruttosio, mannosio, sono usati in extenders come fonti di energia per gli spermatozoi e aiutano a mantenere la pressione osmotica del diluente, sono spesso usati anche come crioprotettore non penetranti (Yildiz et al., 2000; Rigau et al., 2002; England, 2013). Gli spermatozoi canini ottengono l'energia a partire dai processi glicolitici, che sono capaci di svolgere utilizzando glucosio, fruttosio e mannosio (Bartlett, 1962). Secondo Rigau, gli spermatozoi hanno una maggiore motilità e sono più lineari quando congelati con il fruttosio, invece che con il glucosio (Rigau et al., 2001). Anche per Yildiz et al., il fruttosio in diluente a base di TRIS e acido citrico offre un migliore risultato in termini di motilità ed integrità della membrana e degli acrosomi, rispetto al glucosio e ad altri zuccheri (Yildiz et al., 2000).

Gli antibiotici sono aggiunti al diluente per prevenire la contaminazione del seme, principalmente durante la manipolazione dello stesso e durante il periodo del raffreddamento. Gli antibiotici più utilizzati sono la penicillina e la streptomina (Linde-Forsberg, 1991). La contaminazione da parte di batteri può influenzare negativamente la fertilità, per la presenza di batteri, per la produzione di tossine, per la degradazione dei componenti del diluente, o ancora, per la utilizzazione dei substrati metabolici. Questa situazione determina la necessità di incorporare nei diluenti sostanze ad effetto antimicrobico (Watson, 1995).

Protocolli di congelamento

Negli anni sono stati descritti molti protocolli di congelamento che si differenziano per la durata e la modalità con cui vengono effettuate le fasi del procedimento, per il diluente utilizzato ed il numero di diluizioni effettuate prima del congelamento, la concentrazione spermatica finale raggiunta, la rapidità del congelamento e la modalità con cui viene

eseguito: sui vapori dell'azoto liquido o con congelatore programmabile (Stacanescu e Birtoiu, 2010).

La composizione del diluente è vitale per la criopreservazione del seme e deve essere determinata per ogni specie. Foote e Leonard, sono stati i primi ricercatori a investigare la combinazione e la quantità dei vari componenti nei diluenti per la conservazione del seme canino. Dopo aver esaminato gli effetti dei diversi tamponi (citrato, fosfato, glicina), la percentuale di tuorlo d'uovo, e il pH sul seme canino stoccato a 5°C, hanno concluso che la migliore combinazione per conservare la motilità è utilizzare 20% di tuorlo d'uovo, 1,16% di citrato di sodio, 0,75% di glicina, 1% di glucosio e il pH a 6,6. In seguito, l'uso di Tris ha mostrato ripetutamente risultati migliori nella motilità e longevità degli spermatozoi congelati in paillettes. (Foote, 1964; Foote e Leonard, 1964; Olar et al., 1989; Thomas et al., 1993).

Esistono diversi diluenti per il congelamento di seme canino, tra cui il più utilizzato è stato il Tris-citrato-20% tuorlo d'uovo, con aggiunta di antibiotici e glicerolo (Linde-Forsberg, 1991), con il quale si ottengono ottimi risultati post scongelamento (Rota et al., 1995; Ström et al., 1996; Peña et al., 1998b; Silva et al., 2000; Yldiz et al., 2000).

Per essere efficace un protocollo di congelamento deve mantenere costanti alcuni fattori, come la concentrazione spermatica per paillette e la concentrazione del crioprotettore per un corretto rapporto tra queste due concentrazioni la concentrazione iniziale del seme dovrebbe essere elevata, ma questo non è sempre possibile. La centrifugazione è proposta nella letteratura per la standardizzazione di queste variazioni e mantiene costante il volume e la concentrazione spermatica senza che si verifichi una influenza negativa sulle cellule spermatiche (Papa, 1987; Lopes e Papa, 1998; Kirk, 2001). Con la centrifugazione si ottiene un allontanamento della prima e della terza frazione dell'eiaculato, che hanno un effetto deleterio sulla conservazione a lungo termine del seme (Sirivaidyapong et al., 2001). La centrifuga può danneggiare lo sperma quando è troppo veloce. Rijsselaere e il suo team hanno studiato la centrifugazione a quattro velocità: 180 x g, 720 x g, 1620 x g e 2880 x g per cinque minuti. Essi hanno scoperto che le ultime due velocità comportano una violazione dell'integrità della membrana, e hanno concluso che il miglior compromesso tra una velocità abbastanza veloce, per non lasciare troppi spermatozoi nel sopranatante, e sufficientemente lenta per non alterare l'integrità della membrana è una velocità di 720 x g per 5 minuti (Rijsselaere et al., 2002). La maggior parte dei protocolli prevede una centrifugazione effettuata per 5-10 minuti a 600-700g (Stacanescu e Birtoiu, 2010). Dopo la centrifugazione

il plasma seminale viene tolto ed eventualmente può essere congelato separatamente ed utilizzato come diluente post-scongelo (Nöthling e Volkmann, 1993). Schäffer-Somi mostra che la centrifugazione migliora la mobilità degli spermatozoi dopo scongelamento, se il diluente finale contiene l'agente protettivo Equex. In assenza di questo gli effetti positivi della centrifugazione sono persi (Schäffer-Somi, 2006). Il pellet viene invece diluito il prima possibile, in una fase secondo il metodo norvegese (Andersen, 1972), in due, secondo i protocolli Uppsala, CERREC e CERCA (Linde Forsberg, 2005; Benechet, 2007; Briffaut, 2007) o in tre fasi. La diluizione in due fasi prevede l'utilizzo di due diluenti simili ma differenti per l'eventuale presenza di Equex STM paste e per la maggior concentrazione di glicerolo nel secondo diluente. Il primo diluente viene aggiunto a temperatura ambiente, invece il secondo a una temperatura di 4°C subito prima del congelamento per evitare che l'eccessiva concentrazione di glicerolo ed il detergente esercitino i loro effetti tossici sugli spermatozoi (Pena e Linde Forsberg, 2000). La diluizione in una o due fasi non comporta differenze significative sulla qualità post-scongelo (Fontbonne e Badinand, 1993b), a meno che il secondo diluente non contenga Equex. In tal caso è meglio effettuare la diluizione in due fasi (Peña e Linde Forsberg, 2000).

Dopo la diluizione gli spermatozoi sono sottoposti all'equilibratura. Prima del congelamento, gli spermatozoi devono rimanere un determinato periodo di tempo a una temperatura di equilibrio, per diminuire il metabolismo spermatico e per iniziare l'interazione con i componenti del diluente prima dello stress del congelamento, minimizzando, i rischi dello shock termico (Chacur, 1996). L'effetto finale è un aumento della resistenza della membrana ai trattamenti successivi ed un incremento della sopravvivenza degli spermatozoi (Waston, 1990). Olar et al., hanno dimostrato che la miglior motilità post-scongelo è conseguita quando il seme canino viene raffreddato da 37° a 5°C in 1 ora ed equilibrato a 5°C per 2 ore, se viene utilizzato il Tris- tuorlo d'uovo contenente 3 o 4% di glicerolo (Olar et al., 1989), o per circa una ora secondo la maggior parte degli altri protocolli (Stacanescu e Birtoiu, 2010). Al termine dell'equilibratura viene effettuata la seconda diluizione, conforme al protocollo, ed il seme viene confezionato in pellets (Seager e Fletcher, 1973) o in paillettes (Andersen, 1975). La comparazione diretta tra pellets e paillettes per il congelamento non ha dimostrato differenze nella qualità del seme canino post-scongelo (England, 1993). La conservazione in pellets attualmente è stata abbandonata e le paillettes da 0,25 o 0,5 ml vengono preferite in virtù della forma compatta, del maggior rapporto superficie/volume che ottimizza l'uniformità degli scambi termici e della possibilità di identificare più facilmente le

paillette. Ogni paillette è identificata con il nome del cane, il numero di iscrizione al libro genealogico e la data e il luogo del congelamento (Stacaneuscu e Birtoiu, 2010). La concentrazione di spermatozoi nel paillette può influenzare la qualità del seme. Veyer ha dimostrato che concentrazioni tra 50 e 100 milioni di spermatozoi per paillette hanno un risultato migliore sulla la motilità e vitalità dopo scongelamento, rispetto alle concentrazioni di 200 milioni di spermatozoi (Veyer, 2002). Frequentemente il congelamento viene effettuato ponendo le paillettes in una scatola di polistirolo su un rack a 4 cm sopra al livello dell'azoto (Andersen, 1972) oppure mettendo le paillettes in una gobelet in un bidone di azoto liquido ed abbassandola progressivamente (Linde Forsberg, 2005). L'altro metodo, è il congelamento delle paillettes in congelatore programmabile, anche se raramente viene utilizzato per l'alto costo e la necessità di utilizzare notevoli quantitativi di azoto liquido (Andersen, 1972). Per il congelamento, Olar ha ottenuto migliori risultati con un diluente a base di TRIS, tuorlo d'uovo e 2-4% di glicerolo alla velocità di congelamento di 15°C/min (Olar et al., 1989). Hay ha ottenuto dei buoni risultati con la velocità di -12°C/min e -28°C/min (Hay et al., 1997). Rota ha confrontato gli effetti del congelamento rapido (-50°C/min) e lento (-10°C/min) nell'intervallo termico tra -6 e -40°C senza trovare differenze significative (Rota, et al., 1998). Foote, dimostrò che la curva di congelamento più lenta presentava una sopravvivenza spermatica post-scongelamento migliori (Foote, 1964).

Il seme, dopo congelato viene mantenuto nell'azoto liquido a -196°C. Questa temperatura non causa nessuna modificazione all'interno degli spermatozoi, consentendo la conservazione per un tempo indeterminato (Watson, 1990).

Secondo evidenze suggestive, gli spermatozoi congelati possono essere danneggiati dallo scongelamento e questo effetto viene attribuito, principalmente, a ricristallizzazione dei microcristalli di ghiaccio intracellulare durante un scongelamento inappropriato (Watson, 1995). La temperatura a cui si scongela una campione di seme ha una influenza diretta su la vitalità spermatica post-scongelamento, principalmente sull'alterazione dei movimenti spermatici e sull'integrità della membrana (Van den Berg e Rose, 1959; Van Den Berg e Soliman, 1969). Rota et al., hanno studiato due metodi di scongelamento (38°C per 1 minuto e 70°C per 8 secondi) in seme confezionato in paillette di 0,5 ml. Osservarono che lo scongelamento a 70°C per 8 secondi ha aumentato la vitalità e la longevità degli spermatozoi durante l'incubazione a 38°C, quando comparato con il metodo lento dello scongelamento (Rota et al., 1998). Santos et al., osservarono un'elevata percentuale di acrosomi intatti nel

seme canino quando scongelato a una temperatura di 37°C per 30 secondi (Santos et al., 2003).

In generale, il congelamento e lo scongelamento devono seguire lo stesso standard di velocità, ovvero, quando il congelamento è veloce, lo scongelamento deve essere veloce, quando il congelamento è lento, lo scongelamento deve essere lento (Ström et al., 1997).

I metodi di congelamento

Metodo Uppsala

Dopo aver prelevato il seme, in particolar modo la seconda frazione dell'eiaculato, averne valutato la motilità e la concentrazione spermatica, il seme viene centrifugato a 700g per 6 minuti; il sopranatante viene tolto ed il pellet viene diluito a temperatura ambiente con Uppsala extender 1 in modo da ottenere una concentrazione di 400 milioni di spermatozoi/ml. L'equilibratura a 4°C dura 60-75 minuti, anche il diluente Uppsala extender 2 viene posto a 4°C per limitare le escursioni termiche al momento della seconda diluizione, mediante la quale se raggiunge la concentrazione finale di 200 milioni di spermatozoi/ml. Il seme viene accuratamente miscelato capovolgendo più volte la provetta per permettere l'omogeneizzazione dei composti e successivamente viene posto in paillettes da 0,5 ml. Le paillettes sono congelate in un bidone con circa 15 cm di azoto liquido tenendo la gobelet 7 cm al di sotto dell'apertura del bidone per 2 minuti. In seguito la gobelet viene abbassata al livello di 13 cm dall'apertura del bidone e mantenuta per altri 2 minuti, e altri 1 minuto a 20 cm dalla sommità del bidone. Un'alternativa per il congelamento è l'utilizzo di una scatola di polistirolo tenendo le pailletes per 10 minuti sul rack a 4 cm sul livello dell'azoto liquido e immergendole nel liquido dopo raggiunto il tempo (Linde Forsberg, 2005). Secondo Pena il congelamento in scatola di polistirolo offrirebbe dei risultati post-scongelamento migliori rispetto ai campioni congelati in bidone, in particolare riguardo la motilità totale e la percentuale di spermatozoi progressivi (Peña e Linde Forsberg, 2000). Il seme può essere congelato con metodo Uppsala anche dopo 1 o 2 giorni di refrigerazione senza significativo peggioramento della motilità, dell'integrità della membrana e degli acrosomi rispetto al congelamento effettuato subito il prelievo. Questa modalità di esecuzione può permettere un risparmio in termini di tempo e costi per i proprietari che vorrebbero congelare il seme del proprio cane ma vivono ad una notevole distanza da una struttura attrezzata (Hermansson e Linde Forsberg, 2006).

Metodo CERCA

Secondo il protocollo CERCA(Centre d'Etude de Reproduction Canine Assistée) il seme frazionato viene centrifugato a 600-700g per 5-10 minuti, quindi il pallet viene risospeso a temperatura ambiente in 1,5 ml di diluente 1 a base di Tris, fruttosio, glicerolo e tuorlo d'uovo ogni 100 milioni di spermatozoi. Dopo 1 ora di equilibratura viene aggiunto il diluente 2 contenente Equex STM ed il seme viene confezionato in paillettes e congelato sui vapori d'azoto liquido. Dopo qualche giorno una paillette viene scongelata a 70°C per 8 secondi oppure a 37°C per 45 secondi per valutare le caratteristiche post-scongelo. Se la motilità è inferiore a 40% le altre paillette non vengono conservate (Benechet, 2007).

Metodo CLONE

Il metodo CLONE prevede l'utilizzo di diluenti di proprietà (CLONE A e CLONE B), quindi la formula è sconosciuta. Il seme viene centrifugato dopo il prelievo ed il pellet viene diluito in CLONE A ottenendo la concentrazione di 200 milioni di spermatozoi/ml . Il seme viene posto IN equilibratura a 4°C per un'ora, quindi viene aggiunto un uguale quantitativo di CLONE B a 4°C in modo da raggiungere la concentrazione finale di 100 milioni di spermatozoi/ml. Le paillettes vengono riempite e congelate in un bidone di azoto liquido come descritto per il metodo Uppasala. Le paillettes vengono scongelate in bagnomaria a 37°C per 15 secondi e svuotate in una provetta contenete 1 ml di CLONE TM, il diluente per seme scongelato (Ström et al., 1997).

Lo stress ossidativo

Lo stress ossidativo è una condizione caratterizzata da eccessivi livelli di radicali liberi. Questi sono delle specie chimiche neutre particolarmente reattive che presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno e che possono quindi sottrarre elettroni ad altri atomi, trasformandoli a loro volta in radicali liberi e perpetuando il danno in una reazione a catena.

I radicali liberi possono essere suddivisi in due categorie: ROS (Reactive Oxygen Species, specie chimiche derivate dall'ossigeno) e RNS (Reactive Nitrogen Species). Le prime sono più diffuse e comprendono:

- Il radicale superossido $O_2^- \cdot$. Si forma dalla riduzione parziale dell' O_2 quando acquista un singolo elettrone o per azione dell'enzima NADPH ossidasi nei fagociti; è relativamente inerte e non ha la capacità di attraversare le membrane;
- Il perossido di idrogeno H_2O_2 ;
- Il radicale idrossido $OH\cdot$. Può derivare dal perossido di idrogeno con uno ione metallico, più frequentemente ferro o rame (Reazione di Fenton) oppure dalla Reazione di Haver-Weiss che vede come reagenti il perossido di idrogeno ed il radicale superossido. Il radicale idrossido è un ossidante molto potente ed è responsabile dell'ossidazione dei lipidi, nella quale un carbonio adiacente ad un doppio legame acquista o perde un elettrone. La destabilizzazione si diffonde ad altri atomi di carbonio o ad altre molecole lipidiche;
- Il radicale perossilico $RO_2\cdot$; si forma frequentemente dalla reazione dell'ossigeno con un carbonio già destabilizzato dall'interazione con altri radicali, successivamente può attaccare altri atomi di carbonio perpetuando il danno ossidativo (Da Fonseca Nunes da Silva 2006).
- Il radicale alcossido $RO\cdot$;
- L'idroperossiradicale $HO_2\cdot$;
- Il radicale ipoclorito $OHCl \cdot$. (Bansal e Bilaspuri, 2010).

Una delle cause della diminuzione della vitalità degli spermatozoi conseguente a crioconservazione è stata indicata come la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS),

generate dal metabolismo di ossigeno (O_2) (Aitken et al., 1993). In condizioni fisiologiche l' O_2 accetta quattro elettroni e viene ridotto trasformandosi in due molecole di acqua ($2H_2O$).

Un aumento dei livelli di ROS seminale è stata correlata con frammentazione del DNA dello sperma e bassa motilità degli spermatozoi nell'uomo (Mahfouz et al., 2010). Invece nel seme di cane l'aumento delle ROS è imputabile alla presenza di leucociti, alla permanenza in ambiente aerobio ed alle manipolazione, come accade tipicamente durante le procedure di congelamento e scongelamento (Bansal e Bilasuri, 2010). Lo spermatozoo è una cellula attiva, che genera ROS spontaneamente. Questa produzione inizia appena lo spermatozoo esce dalla coda dell'epididimo (Aitken et al., 1993; Aitken, 2000). Negli spermatozoi, una eccessiva produzione di ROS causa perossidazione degli acidi grassi polinsaturati (PUFA) della membrana, deplezione di ATP a cui consegue una diminuita fosforilazione e quindi efficienza metabolica, perdita di elementi citoplasmatici, astenozoospermia e anomalie morfologiche, specie a carico del tratto intermedio (Cassani et al., 2005; Koderle et al., 2009; Bansal e Bilaspuri, 2010). In bassa quantità, i ROS svolgono un ruolo essenziale nella capacitazione degli spermatozoi, iperattivazione della motilità, la reazione acrosomiale e fusione dell'ovocita negli essere umani (Aitken et al., 1993; De Lamirande et al., 1997; Griveau e Le Lannou, 1997; Villegas et al., 2003).

Gli antiossidanti

Con l'obiettivo di migliorare la fertilità del seme congelato, sono stati effettuati diversi studi per migliorare la tolleranza degli spermatozoi durante le fasi di raffreddamento e congelamento. Questi hanno evidenziato l'importanza degli antiossidanti nella protezione cellulare attraverso la riduzione dello stress ossidativo (Guerra et al., 2004). Secondo Halliwell, la funzione degli antiossidanti, quando aggiunti in bassa concentrazione ad un substrato ossidabile, è di rigenerare il substrato o prevenire significativamente l'ossidazione dello stesso (Halliwell, 2000).

Le cellule hanno un sistema di difesa che può agire in due modi:

- come detossificante dell'agente ossidante prima che esso causi lesioni cellulari, rappresentato da: glutathione-S-transferasi (GSTs), superossido dismutasi (SOD), catalasi e glutathione-perossidasi (GSH-Px), come antiossidanti enzimatici; vitamina E come ossidante non enzimatico.

- come linea di difesa, con la funzione di riparare il danno avvenuto, costituita da: acido ascorbico (vitamina C, non enzimatico), glutatione- reduttasi (GSH-Rd) e GSH-Px.

Con l'eccezione della vitamina E (α -tocoferol), che è un antiossidante strutturale della membrana plasmatica, la maggior parte degli agenti antiossidanti si trovano nel citoplasma (Ferrerira e Matsubara, 1997).

A differenza della maggior parte delle cellule, lo spermatozoo perde la maggior parte del suo citoplasma durante il periodo di maturazione, ed è così privato di una frazione di antiossidanti endogeni, che lo rende più vulnerabile a l'azione dei ROS (Carvalho et al., 2002). Conseguentemente, gli spermatozoi eiaculati dipendono della protezione degli antiossidanti presenti nel plasma seminale, che rappresenta quindi, la forma di protezione più importante contro le ROS (Sikka, 2004), ed ha una concentrazione di antiossidanti nel plasma è maggiore di altri liquidi biologici (Taylor, 2001).

Con la diluizione del seme che precede il congelamento, la concentrazione degli antiossidanti diminuisce, e determina uno squilibrio tra agenti ossidanti ed antiossidanti, che è la causa dello stress ossidativo (Bilodeau et al., 2000).

Glutatione (GSH)

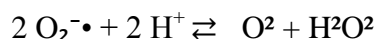
Il GSH (o γ -glutamilcisteinilglicina) è un antiossidante idrosolubile, riconosciuto come il tiolo non proteico più importante nei sistemi viventi. È un tripeptide lineare, costituiti da tre aminoacidi: acido glutammico, cisteina e glicina, con il gruppo tiolo (-SH) presente nella cisteina. Il GSH è la forma ridotta del glutatione, essendo il gruppo (SH) il responsabile per la protezione della cellula contro lo stress ossidativo (Luberda, 2005). Il GSH è essenziale nelle reazioni catalizzate dalla glutatione perossidasi e dalla fosfolipide-idroperossido glutatione perossidasi, durante le quali fornisce un elettrone ai radicali liberi divenendo forma ossidata ovvero glutatione disulfide (GSSG). Il GSSG viene riconvertito in forma ridotta, quindi di nuovo possibile donatore di elettroni, dalla glutatione reduttasi (Stryer et al., 2002).

Strzezek ha rilevato la presenza di glutatione (GSH) in tutte le frazione dell'eiaculato e nelle cellule spermatiche (Marti et al., 2008; Strzezek et al., 2009).

Superossido dismutasi (SOD)

La SOD è un enzima che catalizza la dismutazione dell'anione superossido in ossigeno e

H₂O₂ (Nishikimi e Machlin, 1975).



Secondo Barreiros et al., esistono varie forme comuni di SOD, che sono proteine con cofattori minerali come il rame, zinco, manganese, ferro o nichel. (Barreiros et al., 2006).

Nella riproduzione, l'enzima SOD è stato trovato sia nella cellula spermatica che nel plasma seminale di differenti specie di mammiferi (Storey, 1997).

Enzima glutazione perossidasi

La glutazione perossidasi (GPx) è un enzima presente nella frazione spermatica e post-spermatica, dotato nel seme canino di minore attività rispetto alla superossido dismutasi. Catalizza la formazione di due molecole d'acqua ed una di glutazione disolfuro a partire da 2 molecole di perossido di idrogeno ed una di glutazione (Strzezek et al., 2009).

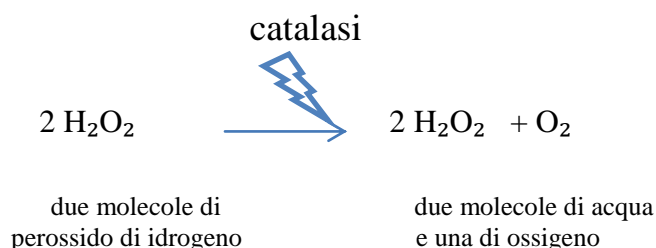
Fosfolipide-idroperossido glutazione perossidasi

Il selenoenzima fosfolipide-idroperossido glutazione perossidasi (PHGPx) agisce sui lipidi di membrana perossidati (Puglisi et al., 2005). E' molto attivo durante la spermatogenesi e si presenta sotto forma di proteina solubile negli spermatidi. Negli spermatozoi canini maturi sembrerebbe tuttavia inattivo (Ursini et al., 1999), o secondo altri autori residua una debole attività (Strzezek et al., 2009).

Catalasi (CAT)

La catalasi è un enzima intracellulare, trovato nella maggior parte degli organismi all'interno dei perossissomi, che sono organelli sferici, dotati di una membrana vescicolare e presenti nel citoplasma. Sono gli organelli responsabili dello stoccaggio di enzimi direttamente coinvolti nel metabolismo del perossido di idrogeno (H₂O₂), sostanza altamente tossica per le cellule, e principale precursore della formazioni di radicali liberi OH⁻ (Ortega et al., 2003). La catalasi appartiene alla sub classe degli enzimi ossidorredutasi, che utilizzano il perossido come recettore e donatore di elettroni (Barreiros et al., 2006). Questa perossidasiidismutail H₂O₂

secondo la reazione chimica :



Ball et al., ha identificato la presenza di CAT nel plasma seminale in particolare nella frazione proveniente dalla ghiandola prostatica, ed hanno ipotizzato che la rimozione del plasma seminale prima del congelamento può diminuire considerevolmente l'attività della enzima (rimozioni di perossido di idrogeno), espongono la cellula spermatica allo stress ossidativo (Ball et al., 2000).

Vitamina C

L'acido L-ascorbico è una vitamina idrosolubile che molti mammiferi, tra cui il cane, sono in grado di sintetizzare a livello epatico grazie all'enzima L-gulonolattone ossidasi e quindi normalmente non hanno necessità di assumerne con l'alimentazione (National Research Council, 2006). L'acido L-ascorbico ha un'azione indirettamente antiossidante: da solo non esercita alcun effetto "scavenger" ma agisce in sinergia con l' α -tocoferolo nel limitare la perossidazione dei lipidi. Nello specifico reagisce con il radicale tocoferossile che si forma dalla reazione dell' α -tocoferolo con un radicale libero e rigenera l' α -tocoferolo. Tuttavia in presenza di ioni di metalli (Cu^{3+} , Fe^{3+}) ha un effetto pro-ossidante: dona un elettrone agli ioni metallici e tali ioni ridotti reagiscono con l'ossigeno formando radicale perossilico e alcossido (Michael et al., 2008). Quando l'acido L-ascorbico è presente in alte concentrazioni l'effetto pro-ossidante si manifesta anche in assenza di ioni metallici. Da ciò deriva che i migliori effetti antiossidanti si ottengono a minimi dosaggi (Combs, 1998). La vitamina C, o acido L-ascorbico, è più abbondante nelle frazioni pre-spermatica e spermatica (Strzezek et al., 2009).

Vitamina E

La vitamina E è un antiossidante non enzimatico, questo nome comprende un gruppo di otto sostanze divise in tocoferoli e tocotrienoli. I primi sono quattro α , β , γ e δ e presentano capacità antiossidante (Bianchi e Antunes, 1999).

La catena laterale dell'alfa-tocoferolo in posizione 2 è lipofila e si immerge nel doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari, cosicché l'anello fenolico resta sulla superficie esterna del plasmalemma ed espone il gruppo idrossile in posizione 6, che è il sito attivo responsabile dell'attività antiossidante (Thakur, 1996). Questo reagisce con alcuni radicali liberi come il radicale perossilico $RO_2 \cdot$ ed il radicale superossido $O_2^{\cdot-}$ (Sies et al., 1992). In queste reazioni l'alfa-tocoferolo viene ossidato a radicale tocoferossile, da cui si può riottenere la forma ridotta e nuovamente attiva grazie all'azione dell'enzima fosfolipide-idroperossido glutatione perossidasi. Da ciò deriva l'azione sinergica dell'alfa-tocoferolo con il selenio, l'oligoelemento che entra a far parte della struttura chimica della fosfolipide-idroperossido glutatione perossidasi, oltre a quella di altri enzimi ad azione antiossidante (Brigelius-Flohe e Traber, 1999).

Secondo Kagan et al., la vitamina E agisce nella protezione di lipoproteine di bassa densità presente nella membrana plasmatica, e sopprime l'ossidazione di questa frazione lipidica fino alla deplezione totale della vitamina stessa e dei suoi analoghi. Tuttavia, sembra che la vitamina E non agisca esclusivamente sui lipidi, ma anche sulle proteine presente nella membrana, conferendo protezione strutturale alla membrana plasmatica dell'azione degli ossidanti (Kagan et al., 1990; Kagan et al., 1992).

La vitamina E non può essere sintetizzata dagli animali, i quali devono necessariamente assumerla attraverso l'alimentazione. Gli alimenti commerciali destinati alla specie canina sono arricchiti con vitamina E in virtù delle sue proprietà nutrizionali ma anche tecnologiche, in quanto questa è efficace nel prevenire e ridurre l'irrancidimento dei lipidi durante lo stoccaggio del prodotto. In seguito a risultati comprovati circa gli effetti benefici della vitamina E nella supplementazione alimentare, è nato l'interesse per l'aggiunta di questo composto ai diluenti per la criopreservazione degli spermatozoi. Tuttavia, la natura lipidica di questo antiossidante rende difficile la sua dissoluzione nei mezzi acquosi comunemente utilizzati.

Trolox®

Il Trolox®, acido carbossilico 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico, è un analogo sintetico idrosolubile e liposolubile della vitamina E. È stato sviluppato e classificato come permeante cellulare, con proprietà antiossidanti (Scott et al., 1974; Fagundes et al., 2011). È stato osservato che il Trolox® può essere ossidato a radicale fenossile che è relativamente

stabile, e rapidamente detossificante, avendo quindi funzione simile alla vitamina E (Davies et al., 1988). Bergmann et al., (1997) hanno valutato la sostituzione del α -tocoferolo con Trolox ® nella preservazione di lipoproteine di bassa densità e hanno osservato che l'analogo della vitamina E è in grado di aumentare il tempo di latenza per la degradazione delle lipoproteine di basse densità, diventando così uno strumento efficiente contro la perossidazione lipidica.

Diluenti contenenti antiossidanti

Taurina ed ipotaurina

Sanches-Partida et al., (1997) hanno valutato gli effetti della taurina e dell'ipotaurina sulla motilità e fertilità degli spermatozoi, e hanno osservato che solo la taurina ha avuto un effetto positivo sulla motilità spermatica, sia in presenza che in assenza di glicerolo. Tuttavia, nonostante il miglioramento della motilità degli spermatozoi, la fertilità del seme congelato in presenza di taurina (50mM) non differiva da quella osservata in seme congelato senza taurina (Sanches-Partida et al., 1997).

In un altro studio è stato congelato il seme canino con metodo Uppsala, arricchendo il secondo diluente con 25, 50 o 75mM di taurina o ipotaurina. I parametri di motilità non differivano, in modo statisticamente significativo tra i gruppi taurina, ipotaurina e controllo (Martins-Bessa et al., 2007).

Catalasi (CAT)

Kawakami et al., hanno valutato cani con parametri riproduttivi normali e cani con astenozoospermia e hanno identificato che in questi ultimi, la CAT presentava attività ridotta. Dopo l'identificazione dei cani con alterazioni nella qualità spermatica, hanno aggiunto 100UI/ml di questa enzima al diluente di mantenimento degli spermatozoi di questi animali, che hanno bassa attività di CAT, e hanno osservato un miglioramento nei parametri seminali dopo incubazione per 3 ore. Hanno quindi concluso che l'aggiunta di questi antiossidanti può migliorare l'indice di motilità in individui con problemi di fertilità (Kawakami et al., 2007).

La catalasi aggiunta alla concentrazione di 300U/ml nei diluenti per il congelamento del seme canino, ha aumentato la percentuale di spermatozoi mobili e progressivi e l'integrità di

membrana dopo lo scongelamento. Secondo Michael et al., la catalasi ha avuto l'effetto positivo più rilevante sulla qualità del seme dopo scongelamento rispetto agli altri antiossidanti provati (vitamina E, vitamina C, vitamina B16, taurina ed ipotaurina e N-acetilcisteina) (Michael et al., 2007). In un studio realizzato da Kmenta et al., è stato concluso che l'uso dell'antiossidante catalasi a 150U/ml in un con extender contenente lecitina allo 0,8% era in grado di aumentare la longevità del seme canino refrigerato per 8 giorni (Kmenta et al., 2011).

Accascina, nel loro studio hanno verificato che l'aggiunta di catalasi (200UI/ml) al diluente per il congelamento del seme canino, non aveva un effetto significativo sulla motilità totale e progressiva. È stata, al contrario, osservata una maggiore diminuzione della motilità totale durante tre ore di incubazione a 37°C, rispetto al controllo (Accascina, 2012).

Vitamina C

Un studio realizzato da Michael et al., è stato osservato un effetto non soddisfacente sulla qualità del seme in seguito all'aggiunta di vitamina C alle concentrazioni di 0, 0,1, 0,5, 1 o 2,5 mM in un diluente contenente tris-glucosio-tuorlo d'uova (Michael et al., 2008). Anche Eulenberger et al., nel loro studio effettuato su seme di cane sottoposto a congelamento secondo il metodo Uppsala con diluente 1 contenente vitamina C alle concentrazioni di 1,2mg/ml, 2,4mg/ml e 4,8mg/ml, non hanno mostrato un miglioramento della qualità del seme dopo scongelamento (Eulenberger et al., 2009).

Vitamina E

Gli effetti da vitamina E possono variare con la dose utilizzata, poiché, secondo la quantità di radicali idrossile che sono inattivati, la vitamina E può presentare l'effetto antiossidante o stimolare l'ossidazione (Cao e Cutler, 1997 citato per Valença e Guerra, 2007).

Katamoto et al., (2006) hanno dimostrato che la vitamina E ha un effetto sulla motilità degli spermatozoi, e che diminuisce le anomalie degli spermatozoi. Inoltre aumenta la motilità nei cani trattati con desametasone, che proteggono le cellule dagli effetti deleteri della perossidazione dei lipidi.

La vitamina E ha avuto degli effetti molto marcati sulla qualità del seme canino refrigerato: dopo 24 e 72 ore aumentavano gli spermatozoi mobili e progressivamente mobili e la percentuale di spermatozoi a membrana integra e diminuiva la produzione di superossido

(Michael et al., 2009). Sul seme congelato gli effetti sono stati molto meno spiccati, in quanto aumentavano solo la percentuale di spermatozoi progressivamente mobili e l'integrità di membrana (Michael et al., 2007).

Trolox®

Peña et al., (2003) hanno utilizzato il Trolox®, nel seme di suini, a una concentrazione di 100 e 200 μM , e hanno identificato che con il dosaggio maggiore risultava una migliore motilità spermatica e un maggiore potenziale della membrana mitocondriale. Breininger et al., (2005), utilizzando sempre il seme suino, hanno aggiunto diverse concentrazioni di acetato di α -tocoferolo (100, 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$), osservando che la dose di 200 $\mu\text{g/ml}$ ha conservato meglio l'integrità mitocondriale, migliorando così l'indice di motilità, dato che la cellula spermatica ha preservato la fonte di energia.

Un studio realizzato da Peixoto et al., (2013) sul seme canino, una concentrazione di 200 μM di Trolox® insieme al glutathione non ha dimostrato un miglioramento significativo nella motilità progressiva e nel vigore spermatico in rispetto al controllo, quando incubati a 37°C per 15 minuti.

In un altro studio il Trolox® a 200 μM non ha influito in modo significativo sulla percentuale di spermatozoi mobili o progressivi, dopo congelamento mentre sugli acrosomi c'è stato un effetto parzialmente positivo. È stata inoltre osservata una variazione dei parametri di motilità ALH e VCL (Accascina, 2012).

Parte sperimentale

Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare l'effetto nel congelamento del seme canino dell'aggiunta al diluente del composto antiossidante Trolox® in tre concentrazioni diverse (100, 200 e 400 μ M). È stato valutato l'effetto di questo composto sulla motilità subito dopo scongelamento (ora 0) e dopo 1, 2 e 3 ore di incubazione a 37°C e sull'integrità della membrana plasmatica all'ora 0 ed all'ora 2 post-scongelamento.

Materiali e metodi

Animali

In questo studio sono stati utilizzati nove cani sessualmente maturi ed in buone condizioni di salute e nutrizione: cinque Labrador Retriever, due Pastori Scozzesi a pelo lungo, un Golden Retriever e un Border Collie. L'età dei soggetti era compresa fra 2 e 8 anni ed il peso tra 22 e 43 kg. Tutti i cani appartenevano a proprietari privati.

Diluenti

Sono stati preparati due diluenti a base di Tris (idrossimetil) amminometano, fruttosio, acido citrico, e glicerolo nella concentrazione del 3% nel diluente 1 e del 7% nel diluente 2. Tutti i componenti utilizzati erano Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Nel secondo diluente è stato aggiunto l'Equex STM paste alla concentrazione dell'1% v/V. I diluenti sono stati allestiti secondo la formula descritta da Rota et al (1997) sostituendo però il glucosio con il fruttosio, nella stessa quantità. Ai diluenti sono stati anche aggiunti benzilpenicillina e streptomicina solfato (Tabella 3).

Il diluente base 1 (CONTR 1) ed il diluente base 2 (CONTR 2) sono stati preparati in due distinti cilindri graduati unendo il Tris, il citrato ed il fruttosio con l'acqua distillata e sterilizzata fino al raggiungimento del volume di 60 ml. In seguito, sono stati aggiunti gli antibiotici e 3 ml di glicerolo nel CONTR 1, oppure 7 ml di glicerolo nel CONTR 2, ed i cilindri sono stati sigillati con parafilm e capovolti più volte, per miscelare i componenti. Si è raggiunto un volume di 80 ml per il CONTR1 e di 79 ml per il CONTR2. A questo punto, sono state rotte manualmente delle uova ed il tuorlo sono stati separati e fatti rotolare delicatamente su un foglio di carta da laboratorio per eliminare i residui di albume. Il beccuccio di una siringa da inseminazione artificiale, con stantuffo privo di lattice, è stato spinto oltre la membrana vitellina in modo da prelevare tuorlo non contaminato da materiale estraneo. In ogni cilindro sono stati aggiunti 20 ml di tuorlo d'uovo (concentrazione finale 20% v/V). I cilindri sono stati capovolti delicatamente. Alla fine, è stato aggiunto l'Equex STM (Nova Chemical Sales, Scituate, Inc, MA, USA) nel CONTR 2. L'Equex STM è stato tenuto prima dell'utilizzo a 37°C per almeno 30 minuti in modo da aumentarne la fluidità. I cilindri sono stati capovolti nuovamente con cura. In ogni cilindro, il pH è stato misurato prima di trasferire i diluenti in provette sterili, in aliquote da 5 ml, per la conservazione a -18°C fino al momento dell'utilizzo.

Tabella 3. Formulazione degli extender 1 e 2 e del diluente post-scongellamento.

	CONTR 1	CONTR 2	Thawing solution
Tris	2,4g	2,4g	2,4g
Acido citrico monoidrato	1,4g	1,4g	1,4g
Fruttosio	0,8g	0,8g	0,8g
Na-benzilpenicillina	100.000 UI	100.000 UI	100.000 UI
Streptomicina solfato	0,1g	0,1g	0,1g
Tuorlo d'uovo	20 ml	20 ml	-
Glicerolo	3 ml	7 ml	-
Equex STM	-	1 ml	-
Acqua distillata	Fino a 100 ml	Fino a 100 ml	Fino a 80 ml

L'antiossidante, Trolox®(Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stato pesato (aliquote da 10 mg) e stoccato in provette tipo Falcon avvolte da pellicola d'alluminio e conservate a temperatura ambiente in un luogo fresco, asciutto ed al riparo dalla luce solare diretta. Subito prima del prelievo del seme è stata preparata la stock solution ed i diluenti finali come descritto in seguito.

Diluente con Trolox®(TROL)

La stock solution del Trolox® è stata preparata subito prima dell'uso aggiungendo 4 ml di CONTR1 a 10 mg di Trolox®. La stock solution è stata utilizzata per preparare i diluenti finali, utilizzando rispettivamente 51 µl, 102 µl e 204 µl di stock solution diluiti in 5 ml di CONTR1 e in 5 ml di CONTR2 per ottenere le concentrazioni finali rispettivamente di 100, 200 e 400 µl Trolox ® (T100, T200, T400).

Diluyente di controllo (CONTR)

Era costituito dal diluente base (CONTR 1 e CONTR 2) senza aggiunta del Trolox®.

Diluyente per lo scongelamento(Thawing solution)

Il diluente per il seme scongelato è stato preparato come descritto nella Tabella 3.

Prelievo e valutazione del seme fresco

Il prelievo del seme è stato realizzato in una stanza tranquilla, con presenza o meno di una cagna in estro, mediante stimolazione manuale, senza forzare gli animali ed interrompendo le operazioni in caso di manifestazioni di stress dell'animale. È stato effettuato un prelievo per quanto possibile frazionato, cercando di ottenere la seconda frazione. In quattro animali il seme è stato raccolto in contenitore di vetro sterile e mantenuto alla temperatura di 37°C prima dell'uso, per gli altre cinque animali la raccolta è stata realizzata con vagina artificiale. Il volume è stato determinato trasferendo il materiale seminale in una provetta con una pipettrice. Immediatamente dopo il prelievo è stata determinata la motilità soggettiva ponendo due aliquote da 5 µl di seme su vetrino riscaldato a 37°C e osservando a 200-400x con microscopio a contrasto di fase equipaggiato di tavolino riscaldato. Un'aliquota da 50 µl è stata diluita in 1,95 ml di soluzione salina al 3%, miscelata e utilizzata per il riempimento della camera di Thoma, attraverso la quale è stata determinata la concentrazione spermatica. Sono stati preparati tre vetrini con un striscio del seme per la valutazione morfologica e per l'esame citologico. Due vetrini, sono stati colorati con Spermac Stain® (Minitüb Abfüll- und Labortechnik GmbH eCo. KG, Tiefenbach, Germany) per valutazione morfologica, mentre il vetrino per l'esame citologico è stato colorato con Diff-Quick® (Medion DiagnosticsInternational Inc., Miami). Per la valutazione della morfologia spermatica sono stati valutati almeno 200 spermatozoi a 1000x (Microscopio Leica DM LB).

Congelamento del seme

Il seme è stato centrifugato a circa 700g (2250 RPM) per 6 minuti. Subito dopo la centrifugazione il sopranatante è stato eliminato, e il seme è stato diviso in quattro parti di ugual volume destinate ai trattamenti previsti (controllo, T-100, T-200 e T-400), al fine di ottenere una concentrazione di circa 200 milioni di spermatozoi/ml. Dopo la diluizione il seme è stato equilibrato a 4°C per 45 minuti, quindi è stata effettuata la seconda diluizione con il diluente 2, raggiungendo una concentrazione finale di circa 100 milioni di

spermatozoi/ml. Le paillettes da 0,5 ml (Cryo BioSystem, IMV Technologies, France), identificati con il nome del cane, il tipo di trattamento e la data del congelamento, sono state riempite con il seme e congelate in scatola di polistirene ponendole 4 cm al di sopra dei vapori dell'azoto liquido per 10 minuti, e successivamente immerse nell'azoto. Le paillettes sono state poste in una o più gobelet e trasferite nel bidone dell'azoto liquido.

Scongelo del seme e valutazioni post-scongelo

Il seme è stato scongelato immergendo le paillette in bagnomaria a 37°C per 30 secondi , sotto al livello dell'acqua. La paillette è stata asciugata accuratamente, tagliata ad entrambe le estremità e svuotata in una provetta mantenuta in bagnomaria. Immediatamente dopo, il seme è stato diluito in proporzione di 1:2 con la thawing solution, anch'essa a 37°C, e mantenuto a tale temperatura in bagnomaria per 3 ore.

Motilità

La motilità è stata valutata con analizzatore di motilità computerizzato (CEROS 12.1 Hamilton Thorne, Inc., Beverly, USA) dopo lo scongelamento, alle ore 0, 1, 2, e 3 post-scongelo. Sono state messe due aliquote da 5 µl in ciascuna camera del vetrino Cell-VU®, a sua volta posto su tavolinetto riscaldato a 37°C. Sono stati valutati quattro campi microscopici per ogni camera, escludendo i campi con deriva spermatica, bolle d'aria o agglutinazioni. Il setup del CEROS è riassunto nella Tabella 4.

Le caratteristiche della motilità valutata sono:

- velocità sulla traccia media (VAP),
- velocità sulla linea retta (VSL),
- velocità sulla linea curvilinea (VCL),
- ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH),
- frequenza dell'attraversamento della linea media (BCF),
- il rapporto VCL/VSL (rettilineità, STR),
- il rapporto VAP/VSL (linearità, LIN),

- motilità totale (MTOT), ovvero percentuale di spermatozoi mobili (VAP > 20 $\mu\text{m}/\text{sec}$, VSL > 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$),
- motilità progressiva (MPRO), ovvero percentuale di spermatozoi
- progressivamente mobili (VAP > 60 $\mu\text{m}/\text{sec}$ and STR > 80%),
- percentuale di spermatozoi rapidi (RAP, con VAP > 60 $\mu\text{m}/\text{sec}$).

Tabella 4. Set up dell'analizzatore d'immagini CEROS 12.1 utilizzato per l'analisi della motilità spermatica.

Acquisizione immagini	Frames acquired	30 immagini per campo
	Frames rate	60 immagini per secondo
Rilevazione delle cellule	Minimum cell size	4 pixel
	Minimum contrast	70
Spermatozoi progressivi	Straihtness thershold	80%
	Low VAP cut-off	60 $\mu\text{m}/\text{s}$
Spermatozoi lenti	VAP cut-off	20 $\mu\text{m}/\text{s}$
	VSL cut-off	10 $\mu\text{m}/\text{s}$
Per campi con cellule mobili <5	Cell size	6 pixel
	Cell intensity	106

Integrità della membrana plasmatica

Questa è stata valutata con Hypo Osmotic Swelling test subito dopo lo scongelamento (ora 0) e dopo 2 ore di incubazione a 37°C. La soluzione per il test è stata preparata sciogliendo

1,08 g di fruttosio in 100 ml di acqua distillata ottenendo così una soluzione di 60 mOsm. Dopo un'accurata miscelazione la soluzione è stata suddivisa in aliquote da 1 ml confezionate singolarmente in provette tipo eppendorf, che sono state congelate. Prima dell'uso, queste sono state portate a 37°C, quindi 100 µl di seme sono stati diluiti nelle provette eppendorf contenenti 1 ml di soluzione. Il campione è stato incubato in termostato a 37°C per 45 minuti. In seguito, sono state prelevate due aliquote da 10 µl dall'eppendorf, e poste su un vetrino portaoggetto riscaldato e ricoperte con vetrini coprioggetto 22x22mm. Ogni goccia è stata osservata al microscopio a contrasto di fase con ingrandimento 400x ed in ciascuna sono stati contati 200 spermatozoi e classificati come swollen (rigonfi) o non swollen.

Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm deviazione standard. Le differenze tra i trattamenti nei parametri di concentrazione spermatica e di percentuale di spermatozoi con membrana plasmatica integra è stata effettuata con ANOVA ad una via. Per i parametri di motilità è stato applicato il GLM all'interno di ciascuna ora di valutazione (0, 1, 2, 3) includendo l'effetto del cane, quello del trattamento e quello dell'interazione cane*trattamento. Le differenze tra i trattamenti sono state valutate post-hoc con Tukey's pairwise comparisons. Le differenze sono state considerate statisticamente significative quando $P < 0,05$.

Risultati

Caratteristiche del seme fresco

I dati relativi alle caratteristiche spermatiche di ciascun eiaculato valutate subito dopo il prelievo sono riassunti nella Tabella n° 5. Il volume medio degli eiaculati prelevati è stato pari a 4,36 ml (range: 1,53-8,0 ml). Mediamente, la concentrazione spermatica ed il numero totale di spermatozoi erano $199 \times 10^6/\text{ml}$ e $727,68 \times 10^6/\text{ml}$, rispettivamente.

Tabella 5. Caratteristiche dei campioni di seme utilizzati in questo studio

	Volume totale (ml)	Concentrazione spermatica ($\times 10^6/\text{ml}$)	Spermatozoi totali ($\times 10^6$)	Motilità soggettiva (%)	Spermatozoi normali (%)
Cane 1	2,55	186,5	115	80	32
Cane 2	1,53	350	535	70	59,5
Cane 3	2,5	162	405	90	74,5
Cane 4	5,3	207	1097	80	88
Cane 5	7,5	174	1305	85	77
Cane 6	8,0	80,5	644	85	67
Cane 7	2,09	258	539,2	80	82,5
Cane 8	7,0	206	1442	90	68,5
Cane 9	2,8	167	467	75	72,5
MEDIA	4,36	199	727,68	81,66	69,05

La motilità soggettiva media era pari a 81,7% (range: 75-90%) e gli spermatozoi morfologicamente normali erano il 69,1% (range: 32-88%). I difetti più rappresentati erano

quelli a carico dello tratto intermedio (11,4% range: 3-29,5%), seguiti da quelli degli acrosomi (8,1% range: 24,5-3,5%), dalle code ripiegate semplici (2,6% range: 1,5-4,5%), e dalle gocce citoplasmatiche distali (1,8% range: 0,5-2,5%).

Motilità post-scongelo

I risultati delle analisi della motilità post-scongelo effettuate all'ora 0, 1, 2 e 3 di incubazione sono illustrate rispettivamente nelle Tabelle 6, 7, 8 e 9. Il seme del cane 7 ha presentato post scongelamento una grande quantità di agglutinazioni spermatiche, e poiché questo poteva interferire con i risultati è stato escluso dallo studio.

All'ora 0 era presente un effetto del cane su tutti i parametri valutati mentre l'interazione cane*trattamento influenzava solo ALH ($P=0.048$). Non è stata osservata nessuna differenza significativa fra i quattro trattamenti.

Dopo un'ora di incubazione l'effetto del cane risultava sempre significativo ad eccezione che per STR e LIN mentre né l'interazione cane*trattamento né il trattamento avevano effetto sui parametri valutati.

Sia all'ora 2 che all'ora 3 l'effetto del cane era sempre presente mentre quello dell'interazione cane*trattamento non lo era mai. Vi era un'influenza del trattamento su MTOT, MPRO e RAP ($P<0,05$) ad entrambe le ore e una tendenza alla significatività su VAP e VSL all'ora 3 ($P<0,1$).

In particolare all'ora 2 la motilità totale e la percentuale di spermatozoi rapidi risultavano inferiori in T400 rispetto a CONTR (rispettivamente $P<0,05$ e $P<0,01$), mentre T100 e T200 presentano valori intermedi. Il trattamento T400 aveva inoltre motilità progressiva più bassa che CONTR ($P<0,001$) e T100 ($P<0,05$), che non differivano fra loro.

All'ora 3 la motilità progressiva e la percentuale di spermatozoi rapidi erano entrambe più basse in T400 rispetto agli altri 3 trattamenti ($P<0,001$ rispetto al controllo, $P<0,01$ rispetto a T100 e $P<0,05$ rispetto a T200) che presentavano valori simili tra loro. Anche la motilità totale era minore in T400 che in CONTR ($P<0,001$) e T100 ($P<0,05$).

Tabella 6. Parametri di motilità rilevati con CEROS all'ora 0 nei campioni di controllo e di trattamento. Media \pm deviazione standard (range).

Ora 0	CONTR	T100	T200	T400
Motilità CEROS (%)	50,88 \pm 12,32 (33,00-70,00)	46,88 \pm 14,26 (18,00-66,00)	49,19 \pm 16,73 (22,00-73,00)	47,19 \pm 15,73 (19,00-69,00)
Motilità progressiva CEROS (%)	38,31 \pm 11,31 (23,00-56,00)	36,38 \pm 12,25 (11,00-53,00)	37,13 \pm 13,63 (16,00-58,00)	36,38 \pm 14,33 (13,00-58,00)
VAP (μ /s)	105,74 \pm 13,04 (83,30-122,20)	108,05 \pm 12,34 (88,60-127,60)	106,32 \pm 10,71 (90,80-124,90)	106,42 \pm 13,06 (90,20-123,90)
VSL (μ /s)	97,54 \pm 13,27 (78,10-113,90)	99,94 \pm 13,35 (77,30-121,10)	97,99 \pm 10,33 (81,60-117,00)	98,52 \pm 13,10 (82,20-118,30)
VCL (μ /s)	142,02 \pm 14,09 (103,90-162,60)	144,69 \pm 10,23 (129,10-163,80)	142,44 \pm 11,82 (116,40-165,70)	142,84 \pm 14,20 (119,20-171,40)
ALH (μ /s)	5,138 \pm 0,721 (4,000-6,500)	5,106 \pm 0,881 (3,900-7,100)	5,044 \pm 0,676 (3,900-6,300)	5,112 \pm 0,787 (4,000-6,500)
BCF (Hz)	29,463 \pm 3,206 (23,600-34,300)	29,319 \pm 3,006 (24,900-34,200)	29,325 \pm 3,302 (22,700-34,300)	30,088 \pm 2,632 (24,800-34,800)
STR (%)	89,500 \pm 2,160 (86,000-93,000)	89,875 \pm 2,604 (85,000-95,000)	89,375 \pm 1,746 (87,000-93,000)	90,000 \pm 1,789 (87,000-94,000)
LIN (%)	67,75 \pm 6,01 (58,00-75,00)	68,13 \pm 7,26 (55,00-79,00)	67,69 \pm 4,87 (60,00-75,00)	68,00 \pm 5,59 (59,00-79,00)
RAP (%)	41,44 \pm 12,63 (25,00-61,00)	39,13 \pm 12,99 (13,00-56,00)	40,31 \pm 15,18 (17,00-63,00)	39,13 \pm 15,35 (14,00-61,00)

Tabella 7. Parametri di motilità rilevati con CEROS all'ora 1 post-scongelo nei campioni di controllo e di trattamento. Media \pm deviazione standard (range).

Ora 1	CONTR	T100	T200	T400
Motilità CEROS (%)	24,00 \pm 19,11 (3,00-59,00)	21,13 \pm 16,94 (1,00-48,00)	20,94 \pm 18,75 (2,00-53,00)	20,19 \pm 15,58 (3,00-50,00)
Motilità progressiva CEROS (%)	15,44 \pm 14,62 (1,00-47,00)	14,50 \pm 13,17 (0,00-38,00)	14,00 \pm 13,05 (1,00-39,00)	12,56 \pm 10,61 (1,00-29,00)
VAP (μ /s)	95,98 \pm 20,97 (52,10-116,00)	98,21 \pm 15,72 (54,90-117,90)	97,75 \pm 12,46 (76,70-117,10)	95,30 \pm 16,33 (60,30-118,10)
VSL (μ /s)	82,74 \pm 20,23 (40,40-107,40)	85,07 \pm 17,18 (39,70-107,10)	85,99 \pm 12,99 (64,80-105,70)	81,71 \pm 16,34 (48,10-108,20)
VCL (μ /s)	155,78 \pm 32,47 (80,90-201,30)	159,23 \pm 25,50 (110,40-202,10)	155,98 \pm 17,23 (133,30-197,70)	153,49 \pm 22,24 (116,80-188,10)
ALH (μ /s)	7,506 \pm 1,129 (5,000-9,300)	7,600 \pm 1,174 (6,200-9,900)	7,450 \pm 1,226 (5,300-9,700)	7,544 \pm 1,314 (3,700-9,100)
BCF (Hz)	23,11 \pm 4,55 (11,10-30,10)	21,92 \pm 5,50 (6,10-30,70)	22,87 \pm 4,17 (10,70-27,60)	23,24 \pm 2,01 (19,00-26,00)
STR (%)	78,53 \pm 19,31 (7,40-90,00)	83,13 \pm 4,76 (69,00-88,00)	83,938 \pm 3,235 (78,000-89,000)	82,75 \pm 4,22 (73,00-89,00)
LIN (%)	53,56 \pm 7,90 (41,00-70,00)	54,88 \pm 8,34 (38,00-68,00)	55,88 \pm 7,86 (46,00-70,00)	54,19 \pm 8,05 (35,00-68,00)
RAP (%)	19,88 \pm 15,71 (1,00-50,00)	17,19 \pm 14,75 (0,00- 42,00)	17,19 \pm 15,03 (1,00-44,00)	15,31 \pm 13,24 (2,00-41,00)

Tabella 8. Parametri di motilità rilevati con CEROS all'ora 2 post-scongelo nei campioni di controllo e di trattamento. Media \pm deviazione standard (range).

Ora 2	CONTR	T100	T200	T400
Motilità CEROS (%)	17,00 \pm 17,15 (0,00-57,00) ^A	12,31 \pm 14,95 (0,00-46,00) ^{AB}	13,44 \pm 14,68 (0,00-48,00) ^{AB}	10,13 \pm 10,03 (0,00-32,00) ^B
Motilità progressiva CEROS (%)	9,94 \pm 12,09 (0,00-40,00) ^A	8,44 \pm 11,14 (0,00-33,00) ^A	7,06 \pm 9,81 (0,00-31,00) ^{AB}	4,88 \pm 6,20 (0,00-19,00) ^B
VAP (μ /s)	75,01 \pm 36,32 (0,00-118,00)	72,0 \pm 41,9 (0,0-117,4)	72,68 \pm 34,51 (0,00-110,20)	63,86 \pm 38,86 (0,00-106,20)
VSL (μ /s)	62,41 \pm 32,05 (0,00-103,30)	61,01 \pm 36,73 (0,00-104,80)	59,28 \pm 30,00 (0,00-97,70)	52,01 \pm 32,73 (0,00-90,60)
VCL (μ /s)	133,0 \pm 59,3 (0,0-183,0)	127,9 \pm 69,8 (0,0-198,6)	128,7 \pm 58,2 (0,0-183,2)	113,7 \pm 67,8 (0,0-199,9)
ALH (μ /s)	6,906 \pm 3,675 (0,000-12,000)	7,063 \pm 3,679 (0,000-10,700)	7,069 \pm 3,776 (0,000-12,800)	5,61 \pm 4,14 (0,00-10,40)
BCF (Hz)	20,96 \pm 8,87 (0,00-28,60)	20,67 \pm 10,88 (0,00-33,80)	21,74 \pm 9,20 (0,00-30,50)	19,59 \pm 10,67 (0,00-34,80)
STR (%)	69,31 \pm 27,50 (0,00-86,00)	65,75 \pm 32,91 (0,00-87,00)	68,13 \pm 27,01 (0,00-87,00)	63,88 \pm 32,11 (0,00-90,00)
LIN (%)	40,50 \pm 18,02 (0,00-62,00)	39,06 \pm 21,05 (0,00-64,00)	40,31 \pm 17,45 (0,00-62,00)	38,31 \pm 20,73 (0,00-65,00)
RAP (%)	12,94 \pm 14,71 (0,00-48,00) ^A	9,50 \pm 12,62 (0,00-38,00) ^{AB}	9,81 \pm 11,90 (0,00-38,00) ^{AB}	6,75 \pm 8,79 (0,00-26,00) ^B

A \neq B per P < 0.05

Tabella 9. Parametri di motilità rilevati con CEROS all'ora 3 post-scongelo nei campioni di controllo e di trattamento. Media \pm deviazione standard (range).

Ora 3	CONTR	T100	T200	T400
Motilità CEROS (%)	11,25 \pm 13,16 (0,00-42,00) ^A	9,06 \pm 14,04 (0,00-42,00) ^A	8,06 \pm 11,54 (0,00-37,00) ^{AB}	4,75 \pm 5,43 (0,00-15,00) ^B
Motilità progressiva CEROS (%)	6,63 \pm 9,41 (0,00-31,00) ^A	5,69 \pm 9,36 (0,00-31,00) ^A	5,56 \pm 9,90 (0,00-35,00) ^A	2,188 \pm 2,482 (0,000-7,000) ^B
VAP (μ /s)	65,8 \pm 44,1 (0,0-115,1)	57,7 \pm 46,7 (0,0-112,2)	54,4 \pm 43,2 (0,0-102,3)	49,4 \pm 41,9 (0,0-109,5)
VSL (μ /s)	55,05 \pm 37,54 (0,00-100,70)	48,36 \pm 39,53 (0,00-98,30)	43,91 \pm 36,30 (0,00-87,30)	41,31 \pm 35,21 (0,00-95,60)
VCL (μ /s)	116,6 \pm 76,2 (0,0-213,3)	103,5 \pm 83,2 (0,0-214,1)	100,0 \pm 76,7 (0,0-202,5)	87,5 \pm 77,8 (0,0-195,7)
ALH (μ /s)	6,53 \pm 4,05 (0,00-11,10)	5,02 \pm 4,66 (0,00-10,50)	4,96 \pm 4,43 (0,00-11,30)	5,46 \pm 4,45 (0,00-10,40)
BCF (Hz)	19,96 \pm 12,63 (0,00-37,20)	16,82 \pm 12,77 (0,00-39,50)	15,98 \pm 11,72 (0,00-29,40)	16,26 \pm 13,46 (0,00-32,80)
STR (%)	60,56 \pm 36,42 (0,00-91,00)	56,00 \pm 39,28 (0,00-91,00)	53,25 \pm 37,51 (0,00-85,00)	51,3 \pm 41,2 (0,0-93,0)
LIN (%)	36,00 \pm 23,14 (0,00-67,00)	33,56 \pm 24,87 (0,00-65,00)	30,06 \pm 22,53 (0,00-55,00)	30,94 \pm 25,41 (0,00-64,00)
RAP (%)	8,25 \pm 11,03 (0,00-36,00) ^A	6,81 \pm 10,93 (0,00-36,00) ^A	6,56 \pm 10,77 (0,00-35,00) ^A	3,125 \pm 3,667 (0,000-10,000) ^B

A \neq B per P < 0.05

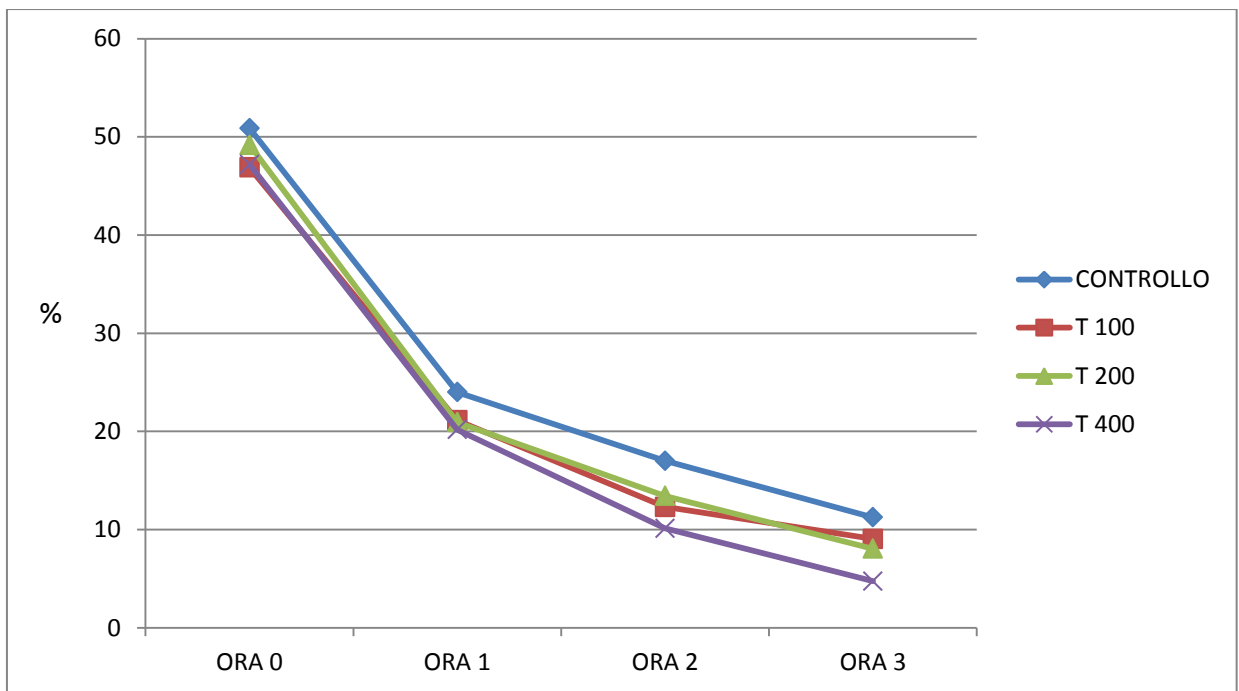


Grafico 1. Motilità totale media dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

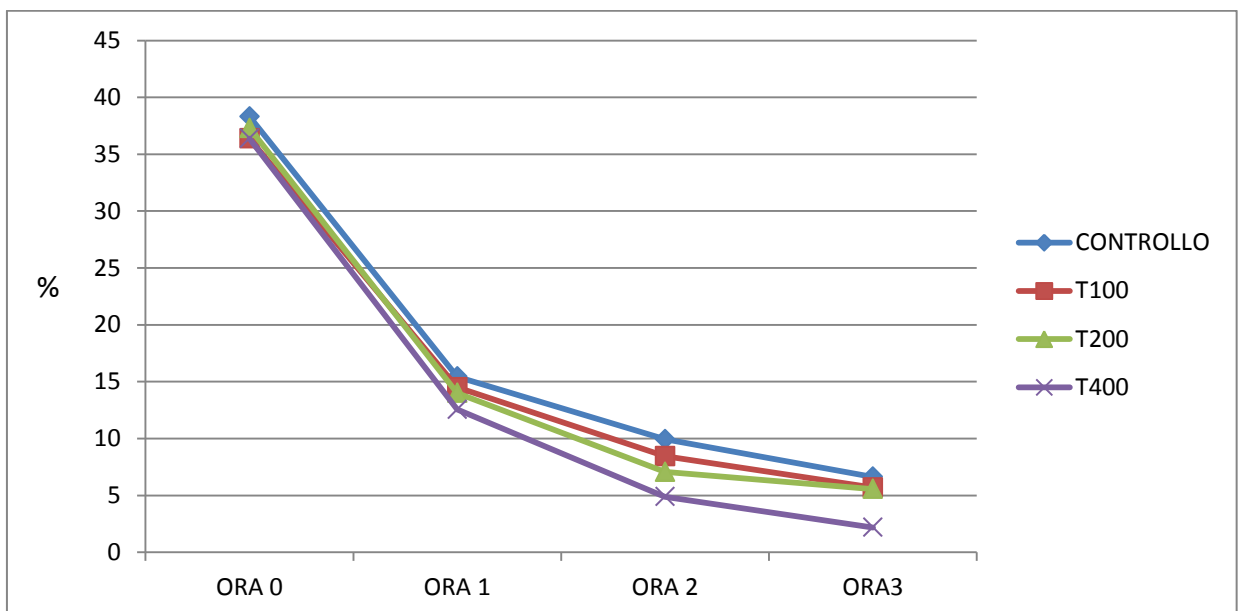


Grafico 2. Motilità progressiva media dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

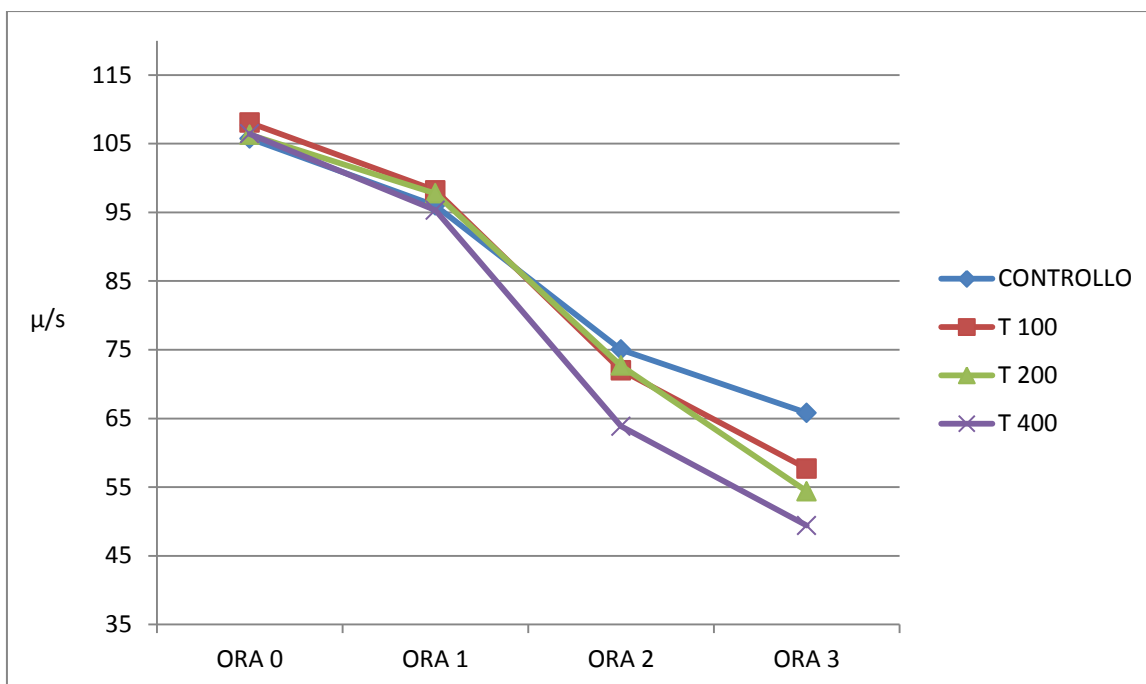


Grafico 3. VAP medi dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

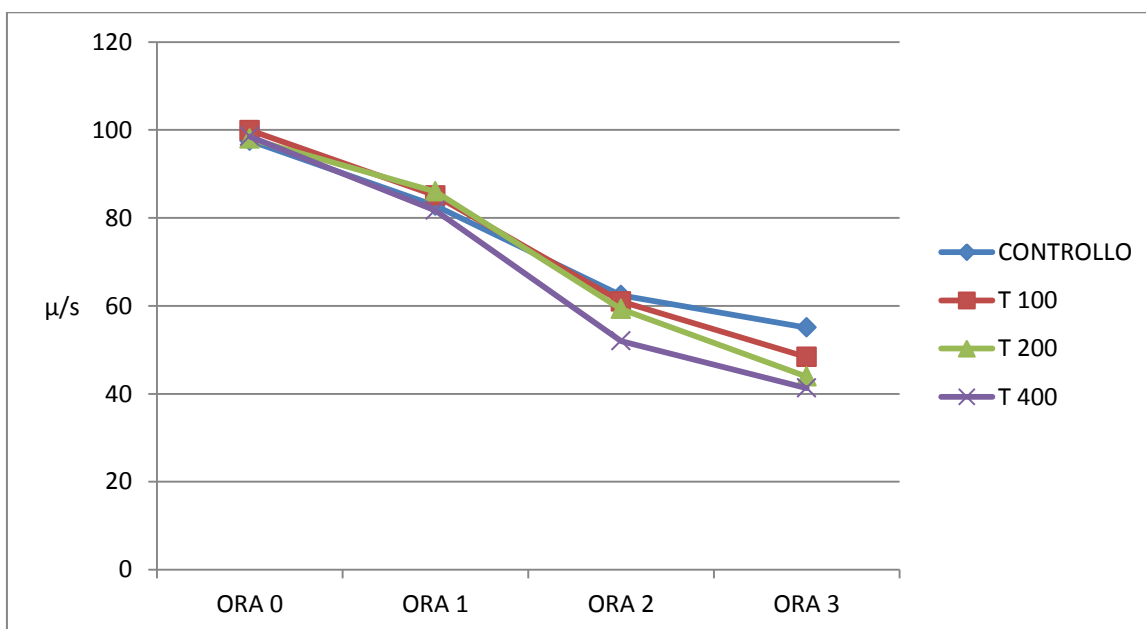


Grafico 4. VSL medi dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

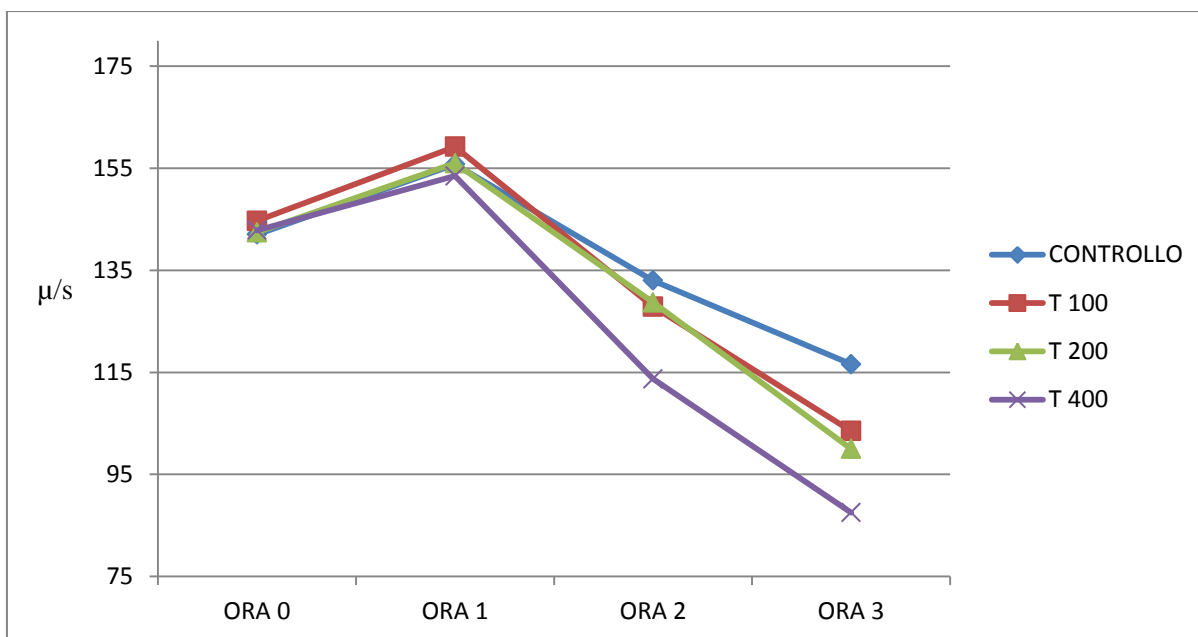


Grafico 5. VCL media dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

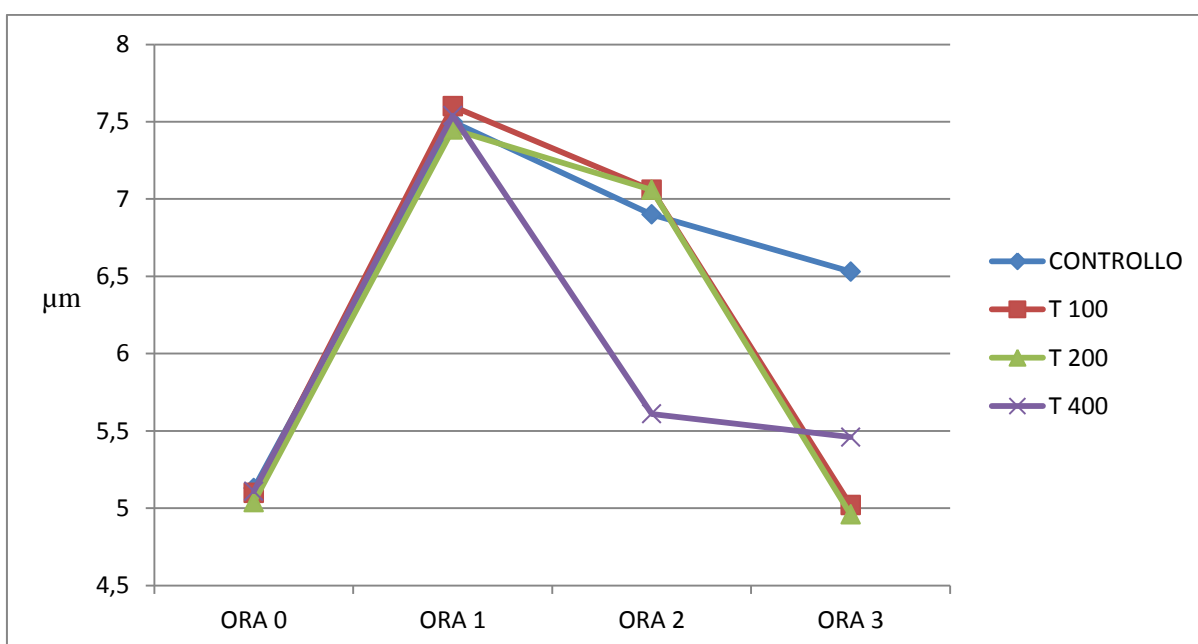


Grafico 6. ALH media dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

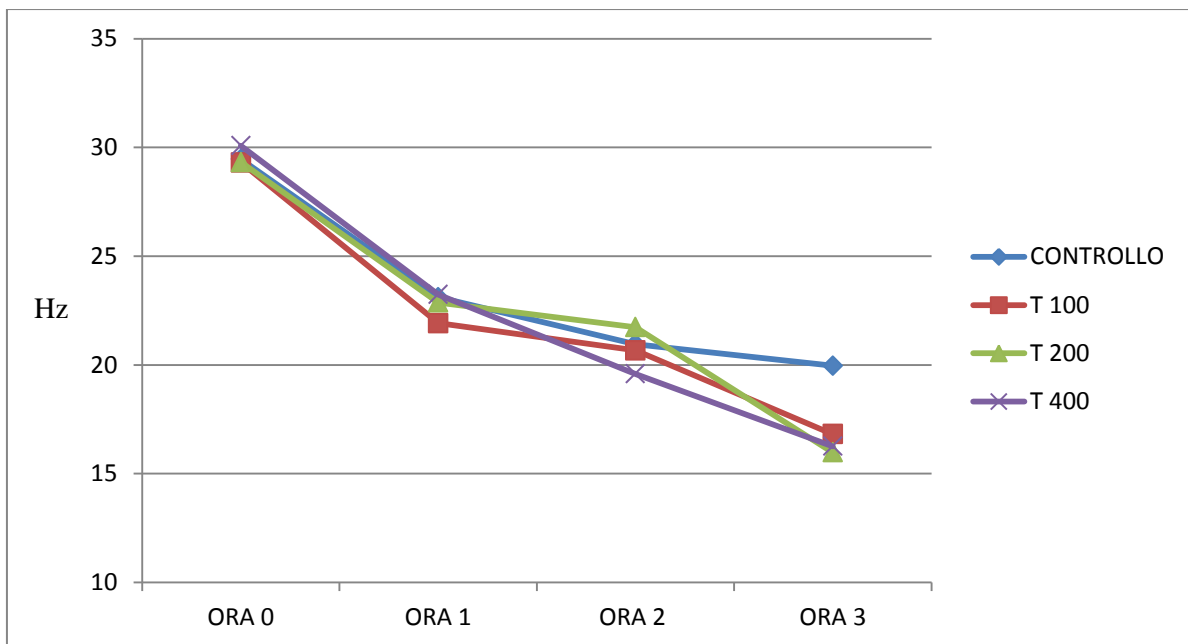


Grafico 7. BCF medi dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

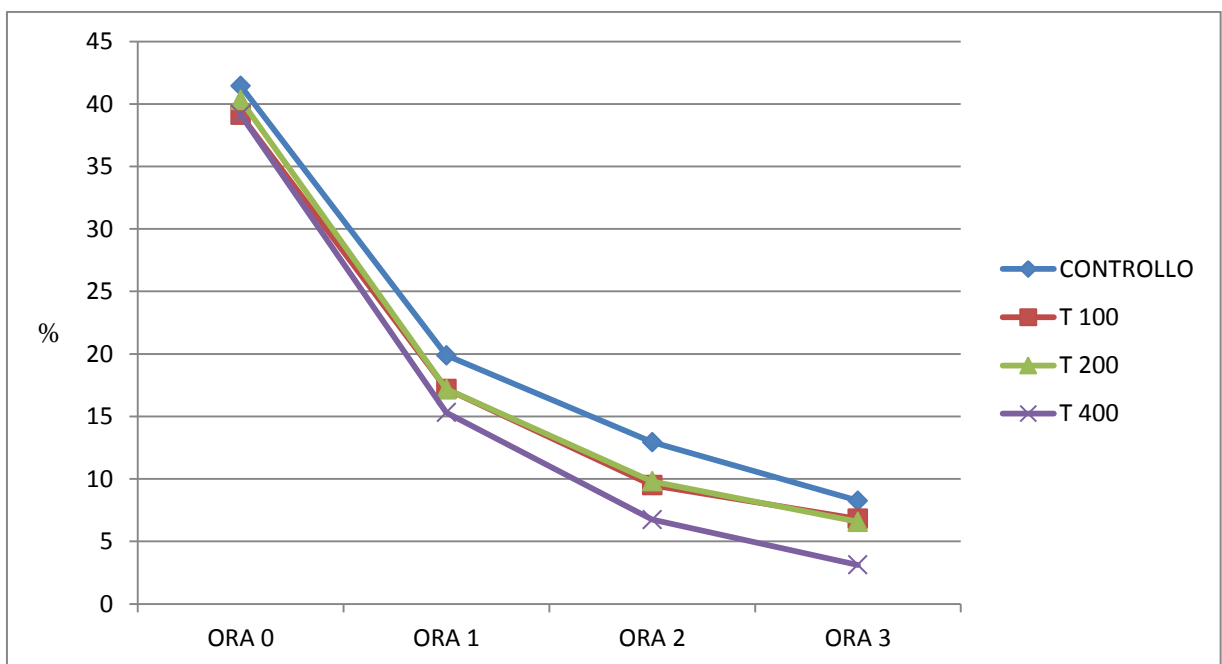


Grafico 8. Percentuale media di spermatozoi rapidi dei campioni di seme nei 4 trattamenti, valutata 0, 1, 2 e 3 ore post-scongelo

Integrità della membrana plasmatica

I dati sull'integrità di membrana rilevati mediante HOS-test all'ora 0 ed all'ora 2 post-scongelo sono illustrati nella Tabella 10 e nel Grafico 10. Non sono state osservate differenze significative tra i trattamenti né all'ora 0 né all'ora 2. L'interazione cane x trattamento non ha evidenziato nessuna differenza tra trattamenti ad entrambe le ore ($P>0.05$).

Tabella 10. Percentuali di spermatozoi a membrana integra (swollen spermatozoa all'HOS-test) osservate all'ora 0 ed all'ora 2 post-scongelo nel controllo e nei trattamenti

	CONTROLLO	T 100	T 200	T 400
ORA 0	50,98±10,47 (39,5-68,5)	43,43±12,76 (28,5-64,0)	47,93±12,20 (32,5-68,5)	42,51±12,10 (23,5-58,0)
ORA 2	42,06±10,80 (32,0-62,0)	37,81±11,94 (19,0-53,0)	39,31±11,41 (24,0-54,5)	38,68±9,00 (24,5-49,0)

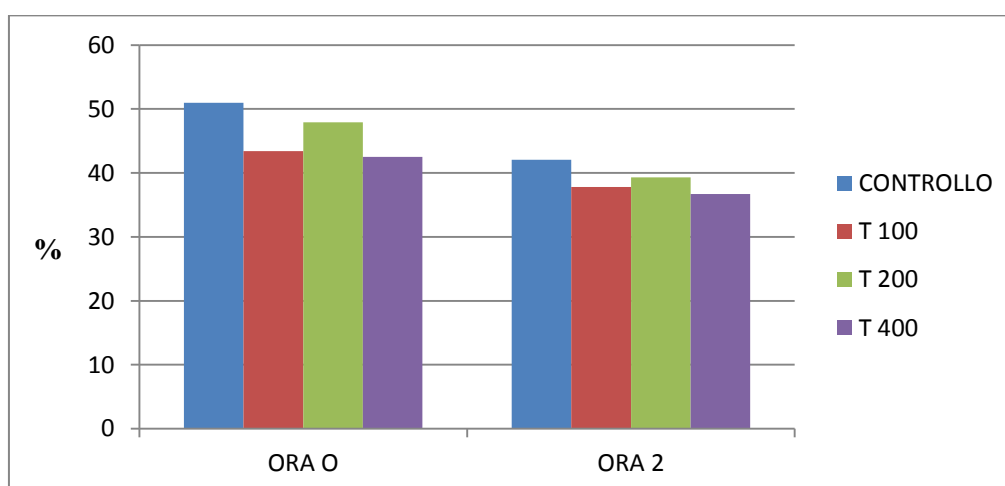


Grafico 9. Percentuali di spermatozoi con membrana plasmatica integra (swollen spermatozoa all'HOS-test) osservate all'ora 0 ed all'ora 2 post-scongelo nel controllo e nei trattamenti.

Discussione

La refrigerazione ed il congelamento sono tecniche che permettono di conservare gli spermatozoi, tuttavia creano contemporaneamente dei danni a queste cellule (Mazur, 1970; Watson, 1995; Holt, 2000). Da quando sono stati messi a punto i primi protocolli per il congelamento del seme canino sono state sviluppate molte ricerche finalizzate al miglioramento della qualità seminale post-scongelo, in particolare alla diminuzione dei danni letali e sub-letali a carico delle cellule spermatiche, che risultano in un minor numero di spermatozoi vitali e nella ridotta fertilità di quelli sopravvissuti al congelamento. I tentativi di miglioramento si sono mossi soprattutto sui fronti delle forme di confezionamento del seme, sulle velocità di congelamento e di scongelamento e sulla diversa composizione dei diluenti, ricercando gli agenti crioprotettivi, le fonti energetiche e le sostanze tampone più adatte agli spermatozoi delle diverse specie domestiche. Ben presto è stato osservato che il successo del congelamento dipendeva anche da fattori individuali, fra cui alcuni immutabili, come le dimensioni della testa degli spermatozoi (Peña et al., 2006), ed altri modificabili, come il contenuto di antiossidanti seminali e lo stato ossidativo del seme (Neagu et al., 2011). Per questa ragione molti lavori di ricerca, come anche questa Tesi, hanno studiato l'effetto dell'aggiunta di antiossidanti esogeni nei diluenti per la conservazione del seme.

In questo studio è stata effettuata una valutazione di alcune parametri della motilità degli spermatozoi con Computer Assisted Sperm Analysis che, oltre a fornire misure precise, accurate ed oggettive, fornisce indicazioni sulla qualità del movimento. La scelta di effettuare la valutazione della motilità post-scongelo è basata sul fatto che è una caratteristica seminale più frequentemente esaminata in virtù dell'importanza di un movimento ottimale ai fini della penetrazione dell'oocita e poiché i danni ossidativi si possono manifestare come riduzione della motilità (Bansal e Bilaspuri, 2010) o modificazione della qualità del movimento, come un aumento dell'ampiezza della deviazione laterale della testa (ALH) e della velocità curvilinea (VCL), che sono caratteristici degli spermatozoi iperattivi.

L'Hypo Osmotic Swelling test è stato il metodo scelto per la rilevazione indiretta dei danni a carico della membrana, che in parte sono causati dalle specie reattive dell'ossigeno: i radicali liberi modificando il doppio strato lipidico e le proteine di membrana ne possono limitare la funzionalità. Una membrana plasmatica danneggiata si manifesta con un assente rigonfiamento quando gli spermatozoi sono posti in una soluzione iposmotica (Aitken e Fisher, 1994).

I tocoferoli ed i tocotrienoli sono dei composti liposolubili, indicati genericamente con il termine “Vitamina E”, che sono inglobati nel doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari e le proteggono dai danni diretti dei radicali liberi. In questo studio è stato utilizzato il Trolox®, un analogo sintetico ed idrosolubile dell’ α -tocoferolo, già testato nel seme congelato o refrigerato di altre specie, tra cui gatto (Thuwanut et al., 2008), verro (Peña et al., 2003), ariete (Maia et al., 2009; Maia et al., 2010; Sicherle et al., 2011), stallone (Ball et al., 2001, Silva et al., 2009) e per gli uomini (Minaei et al., 2012). Nel seme congelato di equino, a differenza di quanto osservato da Ball et al 2001 che non avevano osservato alcun beneficio con l’aggiunta di Trolox®, uno studio successivo ha mostrato un risultato soddisfacente, preservando meglio, quando utilizzato alla concentrazione di 120 μ M/ml, la motilità totale e progressiva degli spermatozoi (Silva et al., 2009). Peña et al., (2003) hanno utilizzato il Trolox® nel seme di suino a una concentrazione di 100 e 200 μ M e hanno identificato che con il dosaggio maggiore risultava una migliore motilità spermatica e un maggiore potenziale della membrana mitocondriale. Breininger et al. (2005), utilizzando sempre il seme di suino, hanno aggiunto diverse concentrazioni di acetato di α -tocoferolo (100, 200 e 500 μ g/ml), osservando che la dose di 200 μ g/ml ha conservato meglio l’integrità mitocondriale, migliorando così l’indice di motilità, dato che la cellula spermatica ha preservato la fonte di energia. Infine, il Trolox® aggiunto alla concentrazione 40 μ M in un diluente per il seme umano ha dimostrato un effetto positivo ($P<0,05$) su VCL, VSL e VAP nel post-scongelo, rispetto alle concentrazioni di 0, 20 e 80 μ M. Anche la percentuale degli spermatozoi mobili post-scongelo era aumentata significativamente ($P<0,01$) (Minaei et al., 2012). Possiamo quindi riassumere questi dati dicendo che nelle specie equina, suina e umana il Trolox® ha avuto, almeno in una parte degli studi un effetto positivo.

Nel cane Michael et al (2007) hanno testato l’utilizzo della Vitamina E, osservando un effetto positivo sulla motilità post-scongelo. Il primo studio in cui è stato utilizzato il Trolox® per il seme canino è stata la tesi di Laurea di Accascina (2012) in cui l’aggiunta di Trolox® alla concentrazione di 200 μ M non ha influito in modo significativo sulla percentuale di spermatozoi mobili o progressivi, benché numericamente i diluenti contenenti Trolox® apparissero i migliori. Per questo motivo in questa tesi si è proceduto a valutare diverse concentrazioni di questo composto. In seguito, uno studio realizzato da Peixoto et al. (2013), sempre sul seme canino ed utilizzando una concentrazione di 200 μ M di Trolox® insieme a glutazione, non ha anch’esso dimostrato un miglioramento significativo nella motilità progressiva e nel vigore spermatico in rispetto al controllo.

I risultati di questa tesi non possono che confermare quanto descritto precedentemente, ovvero che 200 μM di Trolox® incluse nel diluente non migliorano le caratteristiche seminali dopo il congelamento. Inoltre è stato osservato che neanche alla concentrazione di 100 μM si ha un effetto benefico e che anzi utilizzando 400 μM di Trolox la concentrazione è eccessiva e può danneggiare il seme nel tempo, infatti alle ore 2 e 3 il T400 ha dimostrato un risultato in termini di motilità inferiore al CONTR e agli altri trattamenti. Questo ci suggerisce che nel cane non si osserva, a concentrazioni di 100 o più μM l'effetto visto in altre specie e che non si debbano testare concentrazioni superiori.

In conclusione, si può dire che il Trolox® non è stato in grado di migliorare le caratteristiche seminali del seme congelato canino, ed il T400 ha addirittura peggiorato la qualità del seme.

Bibliografia

Abe Y., Lee D.S., Sano H., Akiyama K., Yanagimoto Y.U., Asano T., Suwa Y., Suzuki H. *Artificial Insemination with Canine Spermatozoa Frozen in a Skim Milk Glucose- Based Extender*. In: Journal of Reproduction and Development, vol.54, n.4, p. 290-294, 2008.

Accascina A. *Congelamento del seme canino in diluente contenenti catalasi e/o Trolox ®: effetto su alcune caratteristiche seminali post-scongelo*, Tesi di Laurea, Università di Pisa, 2012.

Aitken R. J., Harkiss D., Buckingham D. *Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function*. In: Journal of. Reproduction. Fertility. May; 98 (1), p. 257-65, 1993.

Aitken J., e Fisher H. *Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk*. In: BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, v. 16(4), p. 259-67, 1994.

Aitken R. J. *Possible redox regulation of sperm motility activation*. In: Journal. Andrology. 21 (4), p. 491-496, 2000.

Aitken R. J., Backer M. A. *Oxidative stress and male reproductive biology*. In: Journal Reproduction. Fertility. vol.16, p. 581-588, 2004.

Amann R.P. *Cryopreservation of sperm*. In: Knobil E., Neill J.D. (eds.). Encyclopedia of reproduction. Volume 1. Academic press, San Diego, 773-783, 1998.

Andersen K. *Fertility of Frozen Dog Semen*. In: Acta Veterinaria Scandinavica, v. 13, p. 128-130, 1972.

Andersen K. *Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique*. In: Zuchthygiene, 10 (1), p. 1-4, 1975.

Babcock D. F. *Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the fluorescein chromophore*. In: The Journal of biological chemistry, 258(10), p. 6380-9, 1983.

Ball B.A., Gravance C. G., Medina V., Baumber J., Liu I. K. M. *Catalase activity in equine semen*. In: Am. J. Vet. Res. 6, p. 1026–1030, 2000.

- Ball B. A., Medina V., Gravance C. G., Baumber J. *Effects of antioxidants on reservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 50 c.* In: Theriogenology, v. 56, p.577-89, 2001.
- Ball B. A., VO A. *Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential.* In: Journal of Andrology, v. 22, p. 1061-1069, 2001.
- Bansal A. K., e Bilaspuri G. S. *Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions.* In: Veterinary medicine international, 2010.
- Barbas J. P., e Mascarenhas R. D. *Cryopreservation of domestic animal sperm cells.* In: Cell and tissue banking, 10(1), 49-62, 2009.
- Barreiros A.L.B.S., David J.M., David J.P. *Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.* In: Quím. Nova, v.29, p.113-123, 2006
- Barth A. D., OKO R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa.* In: Ames: Iowa State University Press, 1989.
- Bartlett D. J. *Studies on Dog Semen. Biochemical characteristics.* In: Journal of reproduction and fertility, 3, p. 190-205, 1962b.
- Benechet N. *Artificial insemination with frozen semen in the dog: analysis of records of dogs followed in the Centre for Reproduction of Carnivorous at the 96 National Veterinary School of Alfort (CERCA) from january 2001 to december 2006.* In: PhD Thesis, Alfort, France, 2007.
- Bergmann A. R., Ramos P., Hermann E., Winklhofer-Roob B.M. *RRR- α -tocopherol can be substituted for by Trolox in determination of kinetic parameters of LDL oxidizability by copper.*In: J Lipid Res, v.38, p.2580-2588, 1997.
- Bianchi M.L.P., Antunes L.M.G. *Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.* In: Rev. Nutr., v.12, p.123-130, 1999.
- Bilodeau J. F., Chatterjee S., Sirard M. A., Gagnon C. *Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.* In: Molecular Reproduction and Development, v.55, p.282–288, 2000.

- Bilodeau J. F., Blanchette S., Gangnon C., Sirard M. A. *Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen*. In: Theriogenology, v. 56, p. 275-86, 2001.
- Blom E.. *The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram*. In: Nordisk veterinary medicine, 25(7), p. 383-91, 1972.
- Briffaut A. *Freezing of canine sperm: determination of the optimal combination of four different factors*. In: PhD Thesis, Lyon, France, 2007.
- Brigelius-Flohé R., Traber M. G. *Vitamin E: function and metabolism*. In: The FASEB Journal, v. 13, p.1145-1155, 1999.
- Breining E., Beorlegui N. B., O'Flaherty C. M., Beconi M. T. *Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen*. In: Theriogenology, 63(8), p. 2126-35, 2005.
- Cardoso R. C.S., Silva A. R., Uchoa D. C., Da Silva L.D.M. *Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations*. In: Theriogenology, v.59, p.743-751, 2003.
- Castelo T. S., Costa L.L.M., Lima G.L., Silva A.R. *Cryopreservation of canine semen in Tris extender added by sodium dodecyl sulfate*. In: Rev. Bras. Reprod. Anim n° 1, vol. 37, p. 53-58, 2013.
- Cassani P., Beconi M. T., O'Flaherty C. *Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen*. In: Animal reproduction science, 86(1), p. 163–173, 2005.
- Carvalho O. F., Ferreira J.D.J., Silveira N.A., Freneau G.E. *Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho*. In: J Bras Patol Med Lab, v.38, p.33-38, 2002.
- Cecim M., Mezzalana A., Soares M. P., Rossi C. A. R. *Ethylene Glycol on canine semen cryopreservation*. In: Ciencia Rural, n° 4, vol.32, Santa Maria, 2002.
- Chacur M.G. *Avaliação da congelação de sêmen bubalino bubalis, com os diluidores glicina, gema, trilady e tes em diferentes tempos de equilíbrio*. p.117, 1996.
- Christiansen I. B.J. *Reproduction in the dog and cat*. In: Eadtbourne, England: Balieres

Tindall, p.80-109, 1984.

Combs G. F. J. *The Vitamins*. In: Fundamental aspects in nutrition and Health. New York Academic Press, (1998).

Concannon P. W., McCann J. P., Temple M. *Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog*. In: J. Reprod. Fertil. Suppl. 39, 3–2. 1989.

Concannon P. W., Battista M. *Current Veterinary Therapy, small animal practice*. Philadelphia: Wv Saunders. p. 1247-1259, 1989.

Da Fonseca Nunes da Silva P. *Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm*. In: Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2006.

Davies M. J., Forni L. G., Wilson R. L. *Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions*. In: The Biochemical journal, v. 255, p. 513-522, 1988.

De Lamirande E., Jiang H., Zine A., Kodama H., Gagnon C. *Reactive oxygen species and sperm physiology*. In: Reviews Reproduction, v. 2, p. 48-54, 1997.

Dott H. M., Foster G. C. *A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain*. In: Reproduction, 29(3), p. 443-445, 1972.

Drevius L. O., Eriksson H. *Osmotic swelling of mammalian spermatozoa*. In: Experimental Cell Research, 42(1), p. 136-156, 1966.

Drevius L. O. *The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models*. Journal of reproduction and fertility, 28(1), p. 41-54, 1972.

Dubiel A. *Evaluation of semen properties and ejaculation reflex in dogs with reference to fertility*. In: Wet Wroclaw, 30, p.181-191, 1973.

Eilts B. E. *Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation*. In: Theriogenology, v.64, p.685-691, 2005.

Ellington J., Scarlett J., Meyers-Wallen V., Mohammed H. O., Surman V. *Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements*. In: Theriogenology, 40(4),

p.725-33, 1993.

England G. C., Allen W. E., Middleton D. J. *An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate*. In: Res. Vet. Sci. 49, 66-70, 1990.

England G. C. W. *The cryopreservation of dog semen*. In: Thesis submitted for Fellowship of Royal College of Veterinary Surgeons, 1992.

England G. C., Plummer J. M. *Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa*. *Journal of reproduction and fertility*. In: Supplement, 47, p.261-70, 1993.

England G. C. W. *Cripreservation of dog semens: a review*. In: Journal of Reproduction Fertility supplement, v.47, p. 243-255, 1993.

England G. C., Millar K. M. *The ethics and role of AI with fresh and frozen semen in dogs*. *Reproduction in domestic animals*. In: Zuchthygiene, 43, suppl 2, p. 165-71, 2008.

England G. C. W. *Dog Breeding, Whelping and Puppy Care*. Suppl. 3, p.315-319, 2013.

Escobar C.J. *Inseminación artificial em caninos*. In: GOBELLO, C. (Ed.). *Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos*. Argentina: Latina, 2004.

Eulenberger K., Schäfer-Somi S., Aurich, C. *Effect of different concentrations of ascorbic acid on motility, membrane integrity and chromatin status of frozen-thawed canine spermatozoa within six hours of storage at 37 degrees C*. *Reproduction in domestic animals*. In: Zuchthygiene, 44 Suppl 2(July), p. 354-8, 2009.

Evans G., Maxwell W. M. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. In: Tropical Animal Health and Production, vol. 23, p. 114-114, 1987.

Evenson D. P., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. *Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility*. In: The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society, 30(3), 279-80, 1982.

Fagundes D. S., Gonzalo S., Grasa L., Castro M., Arruebo M. P., Plaza M. A., Murillo M. D. *Trolox reduces the effect of ethanol on acetylcholine-induced contractions and oxidative stress in the isolated rabbit duodenum*. In: Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva, 103(8), p. 396-401, 2011.

- Farrant J., Walter C. A., Lee H., McGann L. E. *Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing.* In: Cryobiology, 14(3), p. 273-286, 1977.
- Farstad W., Andersen-Berg K. *Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog.* In: J. Reprod. Fertil. Suppl. 39, p. 289–292, 1989.
- Farstad W. *Cryopreservation of canine semen. New challenges.* In: Reproduction in Domestic Animals 44, 336-341, 2009.
- Farstad W. K. *Artificial insemination in dogs.* In: Canine and Feline Reproduction and Neonatology. Ed. Gary England and Angelika von Heimendahl, suppl. 2, v.2, p. 80-84, 2010.
- Feldman E. C., Nelson R. W. *Disorders of the canine male reproductive tract.* In : *Canine and feline endocrinology and reproduction.* In: W.B. Saunders company, Philadelphia, p. 481- 524, 1987 .
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. *Free radicals: concepts, relation diseases, defense system and oxidative stress.* In: Rev. Assoc. Med. Bras.43 (1), p.1–16, 1997.
- Fontbonne A., Dumont C. *Prélèvement et examen de la semence chez le chien.* In : Pages J.P. (eds.). Les indispensables de l'animal de compagnie. Reproduction du chien et du chat. P. 251-260, 1992.
- Fontbonne A., Badinand F. *Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing.* *Journal of reproduction and fertility.* Suppl. 47, p. 531-2, 1993b.
- Fontbonne A., Badinand F. *Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen.* In: J. Reprod. Fert. Suppl, 47, p. 325-327, 1993.
- Fontbonne A. *Infécondité du chien mâle.* In : *Encyclopédie vétérinaire. Pathologie de la reproduction.* In: Elviesier, Paris, vol. 5, p. 1-13, 1995.
- Foot R.H. *The effects of electrolytes, sugars, glycerol and a catalase on survival of dog semen stored in buffered-yolk mediums.* In: American Journal of Veterinary Research, v. 104, p. 32-36, 1964.
- Foot R. H., Leonard E. P. *The influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on the*

- survival of dog sperm in buffered-yolk extenders*. In: Cornell Veterinary, v.54, p.78-89, 1964.
- Foot R. H. *The history of artificial insemination: Selected notes and notables*. In: J. Anim. Sci.80, Suppl. E22–E32, 2002.
- Freshman J. L. *Semen collection and evaluation*. In: Clin. Tech. Small Anim. Pract., 17, 3, p. 104-107, 2002. doi:10.1053/svms.2002.34326.
- Gao D., Mazur P., Critser J. *Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa*. In: A. Karow e J. Critser (Eds.), Reproductive Tissue Banking, p. 263-327. San Diego: Academic Press, 1997.
- Garner D. L., Pinkel D., Johnson L. A., Pace M. M. *Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses*. In: Biology of reproduction, 34(1), p. 127-38, 1986.
- Garner D. L., Johnson L. A. *Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide*. In: Biology of reproduction, 53(2), p. 276-84, 1995.
- Graham E F, Schmehl M. K. L., Nelson D. S. *Problems with laboratory assays*. In: 8th Technical Conference on Artificial Insemination and. Reproduction, National Association of Animal Breeders, Columbia, p. 59-66, 1980.
- Goodwin M., Gooding K. M., Regnier F. *Sex pheromone in the dog*. In: Science. New York, N.Y, 203(4380), p. 559-61, 1979.
- Günzel-Apel A. R. *Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund*. Ed. G. Fischer, Germania, 1994.
- Guerra M. M. P., Evans G., Maxwell W. E. C. *Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura)*. In: Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 28, p. 187-195, 2004.
- Guerin V. *Contribution à l'évaluation du pouvoir fécondant du sperme de chien. Emploi d'un colorant de l'acrosome: le Spermac®*. In: Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude-Bernard, Lyon, p. 95, 1997.
- Hancock J. L. *A staining technique for the study of temperature shock in semen*. In: Nature 167, p. 323–324, 1951.

- Harrison R. A. P., Vickers C. E. *Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa*. In: Journal of reproduction and Fertility, v. 88, p.343-352, 1990.
- Hashida N. H., Abdullah R.B., Rajikin M.H., Matnorr M. *Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrossome-reacted goat sperm*. In: Biomed Res16, p. 119–123, 2005.
- Hay M. A., King W. A., Gartley C. J., et al. *Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction*. In: Theriogenology v.48, p.1329-1342, 1997.
- Hermansson U., Linde Forsberg C. *Freezing of stored, chilled dog spermatozoa*. In: Theriogenology, 65(3), p. 584-93, 2006.
- Hotl W. V. *Basic aspects of frozen storage of semen*. In: Animal reproduction Science, v.62, p.3-22, 2000.
- Holt W. V. *Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences*. In: Theriogenology, v.53, p. 47-58, 2000a.
- Iguer-Ouada M., Verstegen J. P. *Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis*. In: Theriogenology, 55, p. 733-749, 2001.
- Jasko D. J. *Procedures for cooling and freezing of equine semen*. In: Ars Vet, v.10, n. 2, p. 156-165, 1994.
- Jeyendran R. S., Van Der Ven H. H., Perez-Pelaez M., et al. *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics*. In: Journal of Reproduction Fertility, v.70, p219-228, 1984.
- Johnston S. D. *Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital*. In: Vet Clin. Of North AM.: Small Animal Practice, v.21, n. 3, p. 545-551, 1991.
- Johnston S. D., Kustritz, M.V.R., Olson, P.N.S. *Canine and feline Theriogenology, 1 ed.* Philadelphia: Saunders, 2001, p. 592. Saunder.
- Johnston S. D., Kustritz M. V. R., Olson P. N. S. *Semen Collection, Evaluation, and Preservation*. In: Johnston S.D. (eds.). Canine and feline. Theriogenology. W.B. Saunders compagny, Philadelphia, p. 287- 306, 2001.
- Kagan V.E., Serbinova E.A., Packer L. *Recycling and antioxidant activity of tocopherol homologues of differing hydrocarbon chain length in liver microsomes*. In: Arch Biochem

Biophys, v.282, p. 221-225, 1990.

Kagan V. E.; Serbinova E. A.; Forte T.; Scita G. *Recycling of vitamin E in low density lipoproteins*. In: Journal of Lipid Research, v. 33, p. 385-397, 1992.

Katamoto L.K., Baptista S.C.A., Nichi M., Barnabe., V. H., Barnabe R. C., Cortada C.N.M. *Effect of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant nzyme activities in dogs*. In: Theriogenology 66, p. 1610-1614, 2006.

Kawakami E., Takemura A., Sakuma M., Takano M., Hirano T., Hori T., Tsutsui, T. *Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles*. In: The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science, 69(2), p. 133-6, 2007.

Kirk E. S. *Flow cytometric evalutation of stallion sperm*. In: Fort Collins.CO, 2001. p.131. Thesis (Master of Science). Colorado State University, 2001.

Kmenta I., Strohmayer C., Müller-Schlösser F., Schäfer-Somi S. *Effects of lecithin and catalase containing semen extender and second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa*. In: Theriogenology, 2010.

Koderle M., Aurich C., Schäfer-Somi, S. *The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa*. In: Theriogenology, 72(9), p. 1215-20, 2009.

Kumi-Diaka J. *Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test*. In: Theriogenology, v.39, p. 1279-1289, 1993.

Kutzler M. A. *Semen collection in the dog*. In: Theriogenology, 64, p. 747-754, 2005. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.023.

Larsen R. E. *Infertility in the male dog*. D. A. Morrow (Ed.), Current Therapy. In: Theriogenology. Philadelphia: Saunders,1980.

Lees G. E., Castelberry M. W. *The Use of frozen semen for artificial insemination of German shepherd dogs*. In: Journal of the American Animal Hospital Association, 13, p. 382-386, 1977.

- Linde-Forsberg C., Forsberg M. *Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen*. In: Journal of Reproduction Fertility Supplement, v.39, p. 299-310, 1989.
- Linde-Forsberg C. *Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen*. In: The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice, 21(3), p. 467-85, 1991.
- Linde-Forsberg C., Forsberg M. *Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. Journal of reproduction and fertility*. In: Supplement, 47, p. 313-23, 1993.
- Linde Forsberg C. *Artificial insemination*. In: EVASV-EVSSAR-ENVN Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals, p. 5.1-5.23, Nantes, 2005.
- Linde Forsberg C. *Canine artificial insemination and its techniques*. IN: 68° Congresso nazionale SCIVAC. Le domande più frequenti in riproduzione canina e felina, p. 52-57. Milano, 2011.
- Lopes M. D., Papa F. O. *Effects of different diluents and method of centrifugation for canine semen congelation*. In: Congress of the Word Small animal veterinary association, 23, p.799. Buenos Aires. Proceedings, 1998.
- Luberda Z. *The role of glutathione in mammalian gametes*. In: Reprod Biol, v.5, p.5-17, 2005.
- Mahfouz R., Sharma R., Thiyagarajan A., Kale V., Gupta S., Sabanegh E., Agarwal A. *Semen characteristics and sperm DNA fragmenta-tion in fertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species*. In: Fertil. Steril, 2010.
- Marti E, Marti J. I., Muinõ-Blanco T., Cebrián-Pérez J-A. *Effect of the cryopreservation process on the activity and immune localization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa*. In: J Androl, v.29, p.459-467, 2008.
- Martínez I. N., Morán J. M., Peña F. J. *Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance*. In: Journal of Andrology, 27(4), p. 596-603, 2006 .
- Martins-Bessa A., Rocha A., Mayenco-Aguirre A. *Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing*. In: Theriogenology, 68(8), p. 1088-1096, 2007.

- Medeiros A. S. L., Gomes G. M., Carmo M. T., Papa F. O., Alvarenga .M.A. *Cryopreservation of stallion sperm using different amides*. In: Theriogenology, v.58, p.1-4, 2002.
- Medeiros C. M. O., Forell F., Oliveira A. T. D., Rodrigues J. L. *Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?* In: Theriogenology, 57, p. 327-344, 2002.
- Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Saratsis P., Boscós C. *Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa*. In: Theriogenology, 68(2), 204-12., 2007.
- Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E. A., Hadjipavlou-Litina D. J., Saratsis P., Ververidis H. N., Boscós C. M. *Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation*. In: Theriogenology, 70(5), p. 827-35, 2008.
- Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E. A., Hadjipavlou-Litina D. J., Saratsis P., Ververidis H. N., Boscós C. M. *Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa*. In: Animal reproduction science, 112(1-2), p. 119-35, 2009.
- Milovanov V. K. Iskustvennoe osemenenie S.-L. *Artificial insemination in livestock*. In: Zivotnyh. Moscow , 1936.
- Minaei M. B., Barbarestani M., Nekoonam S., Abdolvahabi M. A., et al. *Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility*. In: J. Reprod. Med, v. 10, n° 2, p. 99-104, Iran, 2012.
- Morton D. B., Bruce S. G. *Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs*. In: Journal of Reproduction Fertility, Supplement, v.39, p.311-316, 1989.
- National Research Council. In: Nutrient Requirements of Dogs and Cats, first, p. 234-235. Washington: National Academies Press National Research Council, 2006.
- Neagu V. R., García B. M., Rodríguez A. M., Ferrusola C. O., Bolaños J. M. G., Fernández L. G., Tapia J. A., et al. *Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation postthaw*. In: Theriogenology, v.75(1), p.10-6, 2011.

- Neves M. M., Henry M., Clemente C. A. A., Heneine L. G. D. *Standardization of a technique for canine semen freezing*. In: Acta Scientiae Veterinariae. 37(3), p. 259-263, 2009.
- Nishikimi M., Machlin L.J. *Oxidation of α -tocopherol model compound by superoxide anion*. IN: Arch Biochem Biophys, v.170, p.684-689, 1975.
- Nöthling J. O., Volkmann D. H. *Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination*. In: Journal of reproduction and fertility. Supplement, 47, p. 329-33, 1993.
- Oetl   E. E., Soley J. T. *Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study*. In: Veterinary Medical Review, 59, p. 28-78. Elsevier, 1988.
- Oetl   E. E. *Sperm morphology and fertility in the dog*. In: Journal of Reproduction fertility, v. 47, p.257-260, 1993.
- Olar T. T., Bowen R. A., Pickett B. W. *Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws*. In: Theriogenology, v.31, n.2, p.451-461, 1989.
- Oliveria C. H. *Avalia  o das caracter  sticas do espermatozoide equino congelado submetido a inclus  o e remo  o do colesterol das membranas*. In: 84f. Disserta  o Mestrado em Medicina Veterin  ria. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- Ortega A. M., Izquierdo A. C., Gomez J. J. H., Olivares-Corichi I. M., Torres V. M. M., M  ndez J. J. V. *Peroxidaci  n lip  dica y antioxidantes en la preservaci  n de semen: una revisi  n*. In: Interci  ncia, v.28, p.699-704, 2003.
- Papa O. F. *Contribui  o ao estudo da utiliza  o de s  men congelado de equinos: modifica  es metodol  gicas para o congelamento e insemina  o artificial*. Botucatu, p.150, 1987.
- Papa F. O. Tavares C. V. N., Meira C., Bicudo S. D., Alvarenga M. A. *Glicina-gema: proposta de um novo diluidor para congelaci  o de s  men equino*. In: Simposio internacional de reprodu  o animal,5, v.2, p. 378-84. Portugal. Ananis, 1993.
- Parks J. E. *Hypothermia and mammalian gametes*. In A. Karow e J. Critser (Eds.), Reproductive Tissue Banking, p. 229-261. San Diego: Academic Press, 1997.

Payan-Carreira R., Miranda S., Nizański W. *Artificial insemination in dogs*. In: Artificial Insemination in Farm Animals, ed. Milad Manafi, v. 45, p. 51-78. In-Tech, 2011.

Peixoto P. C. V. A., Coletto Z. F., Moura C. S., Almeida F. C., Soares P.C., Silva S. V. E. *Effect of Trolox and glutathione reduced (GSH) addition on the in vitro viability of dog cryopreserved sperm*, 2013.

Peña A. I., Barrio F., Quintela L. A., Herradon P. G. *Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity*. In: Theriogenology, 50, p. 163-174, 1998.

Peña A. I., Quintela L. A., Herradon P. G. *Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry*. In: Theriogenology, 50, p. 1211-1220, 1998.

Peña, A., Barrio, F., Quintela, L.A., Herradon, P.G. *Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity*. In: Theriogenology, v.50, p.163-174, 1998b.

Peña A. I., Linde-Forsberg C. *Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa*. In: Theriogenology, 54, p. 859-875, 2000.

Peña A., Linde-Forsberg C. *Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa*. In: Theriogenology, 54(5), p.703-18, 2000.

Peña F J., Johannisson A., Wallgren M., Rodriguez Martinez H. *Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate*. In: Animal reproduction science, 78(1-2), p. 85-98, 2003.

Peña M. A.I. *Canine fresh and cryopreserved semen evaluation*. In: Anim. Reproduction Science, 82-83, p. 209-224, 2004.

Peña F. J., Núñez-Martínez I., Morán J. M. *Semen technologies in dog breeding: an update. Reproduction in domestic animals*. In: Zuchthygiene, 41 Suppl 2, p. 21-9, 2006.

Ponglowhapan S., Essén-Gustavsson B., Linde Forsberg, C. *Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen*. In: Theriogenology, 62(8),

p. 1498-517, 2004.

Puglisi R., Tramer F., Carlomagno G., Gandini L., Panfili E., Stefanini M., Lenzi A., et al. *PHGPx in spermatogenesis: how many functions?* In: *Contraception*, 72(4), p. 291-3, 2005.

Purswell B. J., Althouse G., Root M. *Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. Proceedings of the annual meeting.* In: Society for Theriogenology. Hastings, Nebraska, 1992.

Rigau T., Farre M., Ballester J., Mogas T., Pena A., Rodrigues-Gil, J. E. *Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates.* In: *Theriogenology*, v.56, p.801-15, 2001.

Rigau T., Rivera M., Palomo M. J. et al. *Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa.* In: *Reproduction*, v.123, p. 579-591, 2002.

Rijsselaere T., Van Soom a., Maes D., De Kruif A. *Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa.* In: *Theriogenology*, 57, p.1669-1681, 2002.

Rijsselaere T., Van soom a., Maes D., Verberckmoes S., De Kruif A. *Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa.* In: *Theriogenology*, 61, p.1589-1602, 2004.

Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D., De Kruif A. *New techniques for the assessment of canine semen quality : a review.* In: *Theriogenology*, 64, p. 706-719, 2005.

Rijsselaere T., Maes D., Van den Berghe F., Soom A. *Preservation and shipment of chilled and cryopreserved dog semen.* In: *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 80, 2011.

Rodriguez- Gil J.E., Montserrat A., Rigau T. *Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa.* In: *Theriogenology*, 42, p. 815-829, 1994.

Root K. M. V. *The value of canine semen evaluation for practitioners.* In: *Theriogenology* 68, p.329-337. United States, 2007.

Rota A., Ström B., Linde Forsberg, C. *Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C.* In: *Theriogenology*, 44, p. 885-900, 1995.

Rota A., Linde-Forsberg, C., Vannozzi, J., Romagnoli S., Rodriguez-Martinez H *Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing*

- rate. In: *Reproduction in Domestic Animals* v. 33, p. 355-361, 1998.
- Rota A., Strom B., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H. *Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C*. In: *Theriogenology*, 47, p. 1093-1101, 1997.
- Rota A., Iguer-Ouada M., Verstegen J., Linde-Forsberg C. *Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STMpaste*. In: *Theriogenology*, 51, p. 1045-1058, 1999.
- Rota A., Milani C., Cabianca G., Martini M. *Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation*. In: *Theriogenology*, 65, p. 1848-1858, 2006.
- Salisbury G. W., Willett E. L., Seligman J. *The Effect of the Method of Making Semen Smears upon the Number of Morphologically Abnormal Spermatozoa*. In: *Journal of animal science*, 1(3), p. 199-205, 1942.
- Sánchez-Partida L. G.; Setchell B.; Maxwell W. M. C. *Epididymis compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa*. In: *Reproduction, Fertility and Development*, v. 9, p. 689-696, 1997.
- Santos O. E. C. *Viabilidade "in vitro" do sêmen de cão submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores*. Belo Horizonte, MG: UFMG.2003. In: *Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, 2003.
- Schaffer H. E., Almquist J. O. *Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture*. In: *Journal of Dairy Science* Dairy Science, 31, p. 677, 1948.
- Schafer-Somi S.; Kluger S.; Knapp E. et al. *Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa*. In: *Theriogenology*, 66, p. 173–182, 2006.
- Scott J. W., Cort W. M.; Harley H., Parrish, D. R., Saucy G. *6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants*. In: *Journal of the American Oil Chemist's Society*. v.51, p.200-203, 1974.
- Scott M. A. *A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract*. In: *Animal reproduction science*, 60-61, p. 337-348, 2000.

- Sekoni V. O., Gustafsson B. K., Mather E. C. *Influence of wet fixation, staining techniques, and storage time on bull sperm morphology*. In: Nordisk veterinary medicine, 33(4-5), p. 161-6, 1981.
- Seager S. J., Fletcher W. S. *Progress on the use of frozen semen in the dog*. In: The Veterinary Record, v.92, p. 6-10, 1973.
- Sies H., Stahl W., Sundquist A. R. *Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids*. In: Annals of the New York Academy of Sciences, 669, p. 7-20, 1992.
- Sikka S. C. *Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology*. In: Journal of Andrology, v. 25, p. 5-18, 2004.
- Silva L.D., Onclin K., Lejeune B., Verstegen J. P. *Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen*. In: Vet. Rec. 138, p. 154-157, 1996.
- Silva K. M. G., Moraes T. P. A., Silva E. C. B., Gamboa S. C., Guerra M. M.P. *Effect of trolox and pentoxifylline on motility and integrity of, acrosome and DNA of equine spermatozoa after thawing*. In: Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, v. 61, n° 1. Belo Horizonte, 2009.
- Silva A.R., Cardoso R. C., Silva L. D. M. *Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluentes a base de Tris e água de coco*. In: Ciências Rural, v.30, p. 1021-1025, 2000.
- Silva A. R. *Otimização de uma metodologia para congelamento do sêmen canino diluído em tampão Tris*. In: 73f. Dissertação Mestrado em Ciências Veterinária. Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2001.
- Silva K. V. G. C., Cunha I. C. N., Lopes B.V., Rocha A.A. *Padronização de um novo teste hiposmótico (HOS) para a avaliação espermática na espécie canina*. In: Encontro da sociedade brasileira de transferência de embriões, Angra dos Reis, 2005.
- Sirivaidyapong S., Ursem P., Bevers M.M., Colenbrander B. *Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa*. In: J. Reprod. Fert. Suppl., 57, p. 383-386, 2001.

- Soares M. P., Rossi C. A. R., Mezzalira A., Cecim, M. *Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino*. In: *Ciência Rural*, 32(4), 649-655, 2002.
- Smith S. C., England G. C. *Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis*. *Journal of reproduction and fertility*. In: Supplement, 57, p. 151-9, 2001.
- Stacanescu M., Birtoiu A. I. *Comparative studies of canine semen freezing protocols*. In: *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 67(2), p. 209-215, 2010.
- Storey BT. *Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa*. In: *Mol Hum Reprod*, v.3, p.203-214, 1997.
- Stornelli A., Arauz M., Baschard H., De La Sota R.L. *Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: alkaline phosphatase as an indicator of tubular patency*. In: *Reproduction in Domestic Animals*, 38(1), p. 1-4, 2003.
- Strom B., Rota A., Linde-Forsberg C. *In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation*. In: *Theriogenology*, 48, p. 247-256, 1997.
- Ström B. *Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay*. In: *Reproduction*, 119(2), p. 201-206, 2000.
- Stryer J., Berg J. M., Tymoczko J. L. *Biochemistry* In: (5th ed.). W. H. Freeman e Co Ltd, 2002.
- Strzezek R., Koziorowska-Gilun M., Kowalówka M., Strzezek J. *Characteristics of antioxidant system in dog semen*. In: *Polish journal of veterinary sciences*, 12(1), 55-60, 2009.
- Talbot P., Chacon R. S. *A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm*. In: *The Journal of experimental zoology*, 215(2), p. 201-8, 1981.
- Taylor C. T. *Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility*. In: *Environ Toxicol Pharmacol*, v.10, p.189-198, 2001.
- Thakur M. *Vitamin-E metabolism and its application*. In: *Nutrition Research*, 16(10), p. 1767-1809, 1996.
- Thomas P. G. A., Surman V., Myers-Wallen V. N. et al. *Addition of sodium dodecyl sulphate*

to tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. In: Int. Cong. Anim. Reprod. AI, 12, 1992. Proceedings v.4, p.1823-1825, 1992.

Thomassen R., Sanson G., Krogenaes A., Fougner J. A., Berg K. A., Farstad W. *Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach.* In: Theriogenology, 66(6-7), p. 1645-50, 2006.

Tsutsui T., Tezuka T., Shimizu T., Murao I., Kawakami E., Ogasa A. *Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches.* In: Jpn. J. Vet.Sci. 50, p. 193–198, 1988.

Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohé L. *Dual function of the seleno protein PHGPx during sperm maturation.* In: Science (New York, N.Y.), 285(5432), p. 1393-6, 1999.

Valença R. M. B., Guerra M. M. P. *Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno.* In: Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

Van den Berg L., Rose D. *Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solutions: the reciprocal system $KHPONaHPOHO$.* In: Archives of Biochemistry and Biophysics, 81(2), p. 319-329, 1959.

Van Den Berg L., Soliman F. S. *Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on changes in composition and pH of buffer salt solutions during freezing.* In: Cryobiology, 6(2), p. 93-97, 1969.

Verstegen J. P., Iguer-Ouada M., Onclin K. *Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice.* In: Theriogenology, v.57, p.149-179, 2002.

Veyer E. *Congélation de semence dans l'espèce canine. Effets de la concentration en spermatozoïdes, du volume des paillettes et de la température de décongélation sur la qualité de la semence après décongélation.* Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, p. 60, 2002.

Villegas J., Kchr K., Soto L., Henkel R., Miska W., Sánchez R. *Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa.* In: Andrologia 35, p. 227–232, 2003.

Wales R. G., WHITE I. G. *Viability of diluted dog spermatozoa in vitro.* In: Journal of Reproduction and Fertility, 5, p. 67-76, 1963.

Watson P.F. *The effects of cold shock on sperm cell membranes* In: Morris, E.J., Clark A. (Eds). *The effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press,. p.189-218, 1981

Watson P. F. *Artificial insemination and the preservation of semen*. In G. E. Lamming (Ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol. 2, p. 747–869. Churchill Livingstone, 1990.

Watson P. F. *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. In: *Reproduction, fertility, and development*, 7(4), p. 871-91, 1995.

Wildt D. E. *Diagnostic procedures, laparoscopy*. In T. Burke (Ed.), *Small Animal Reproduction and Infertility. A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*. p. 121-140. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986.

Wilson M. S., *Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen sêmen*. In: *Journal of Reproduction Fertility*, v.47, p. 307-311, 1993.

Wong W. T., Dhaliwal G. K. *Observations on semen quality of dogs in the tropics*. In: *The Veterinary Record*, 116(12), p. 313-4, 1985.

Yildiz C., Kaya A., Aksoy, Tekeli T. *Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing*. In: *Theriogenology*, 54, p. 579-585, 2000.

Ringraziamento

Il mio primo ringraziamento va a lui che mi ha portato qui, e mi ha fatto vivere questa esperienza unica. Lui che è stato sempre al mio fianco, nei diversi momenti della mia vita, me sostenendo in ogni lamento, dolori, mancanza, stress, felicità, realizzazione. Gordo toda raba, muito obrigada, senza di te niente di questo stava succedendo adesso.

Obrigada a minha família que mesmo distante esta sempre ao meu lado, me apoiando em qualquer decisão. Pai, Mae, obrigada por tudo que vocês fazem, fizeram e continuaram fazendo por mim, amo vocês mais que tudo.

Grazie a i miei animali che me portano sempre allegria in qualsiasi momento della mia vita.

Grazie dottoressa e professoressa Rota, che mi ha lasciato essere la sua ombra per questi periodi. Grazie per avere dedicato e condiviso il suo tempo con me sia professionalmente che personalmente, per la pazienza di spiegarmi e farmi imparare su la riproduzione canina. Grazie per tutto e che San Longuinho non ti lasci perdere più niente. Grazie ancora a Chiara per la pazienza e per avermi aiutato tantissimo, senza di lei non potrei avere finito questo studio.

Grazie a tutti i proprietari che hanno seduti il proprio animali per la realizzazione di questo studio.

Ringrazio anche tutti quelli che lavorano (professori, segretarie, lo staff di pulizia, le persone del laboratorio, ecc) nell'Ospedale Veterinario Mario Modenato, questo posto che è diventato la mia seconda casa, e voi siete diventati la mia famiglia per questi 3 anni. Grazie a tutti di ecografia che mi hanno accettato parlando vacca da latte e gallina d'uova, e se oggi riesco a capire qualcosa su un ecografo, il merito è tutto di voi di ecografia. Grazie mille a tutti di anestesiology, che mi hanno spiegato e fatto imparare tante cose che nell'università mai avevo fatto, come mettere l'agocanula in una vena che sambava. Grazie anche a tutti della chirurgia, che mi hanno fatto vedere e partecipare dei più diversi interventi. Grazie a tutti i dottori di terapia intensiva che sempre me hanno spiegato il perché delle cose; ma un grazie speciale vanno a Sonia che dell'inizio mi ha aiutato sia con una presentazione su sistema endocrino, sia su la pratica in terapia intensiva, a Gianila, che ha più fiducia su di me che me stessa. Mai dimenticherò: "attacca l'ECG", e per l'ultimo Lucia, Luci, con lei ho imparato le cose che non si impara mai nell'università, e che sono fondamentali per quelli che lavorano con animali. Grazie mille a tutti voi.

Toda raba alla mia famiglia israeliana (suocere, cognati e amici) che sono stati sempre vicino e hanno fatti questi 3 anni essere più divertente. Toda raba per lasciarmi fare parte del vostro mondo.

Un gigantesco grazie a Claudia, per questa amicizia, e per essere un'amica per tutte le ore.

Grazie a una piccola persona che mi ha fatto sorridere, principalmente con le telefonate, mi portando così tanta allegria. Edoardo, grazie per fare le miei giornate e serate più bella e felice.

Gracias a Lucina, una amica che ho conosciuto da poco ma è diventata importante in questo momento della vita, grazie per i consigli e per non lasciarmi disanimare mai.

Grazie alla Prof.ssa Biagi che dal primo giorno che ho deciso di fare specializzazione mi ha aiutato tantissimo.

Grazie a tutti i miei colleghi che ho conosciuto nella scuola di specializzazione, grazie per aiutarmi in questi periodi, sia imprestando l'appunti, sia per fare le presentazione, sia per il passaggio fino a Pisa.

Grazie anche a tutti gli amici che ho fatto qui.

Grazie a tutti voi, ogni uno rimarrà nel mio cuore, grazie per tutto che avete fatto per me. Mi mancherete.